

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

F I

BEST AVAILABLE COPY

C 1 2 Q 1/68

A 9453-4B

C 0 7 H 21/04

B 8615-4C

C 1 2 N 15/09

Z N A

9281-4B

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 62 頁)

(21) 出願番号 特願平5-513529
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)1月29日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)7月29日
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/01040
 (87) 国際公開番号 WO93/15228
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)8月5日
 (31) 優先権主張番号 07/827, 975
 (32) 優先日 1992年1月29日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP, KR, US

(71) 出願人 日立化成工業株式会社
 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
 (72) 発明者 ケラー, シリア
 アメリカ合衆国, 92630, カリフォルニア,
 エル トロ ダンディー 25971番地
 (72) 発明者 三橋 将人
 アメリカ合衆国, 92714, カリフォルニア,
 アーバイン ブルックモント 8番地
 (72) 発明者 秋田谷 龍男
 茨城県日立市高鈴町一丁目16-15-2 平
 沢テラス20-2
 (74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外3名)

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド固定化担体

(57) 【要約】

本発明は、不溶性担体とその不溶性担体に固定化されたヌクレオチドを含むヌクレオチド固定化担体を提供する。このポリヌクレオチドは、mRNAのポリアデニル酸テイルに相補的な配列を少なくとも一つ含む。このヌクレオチド固定化担体は、センス及びアンチセンスcDNAや一本鎖cDNAの合成を含む種々の方法に有用である。このヌクレオチド固定化担体は、また、センスおよびアンチセンスmRNAの合成にも有用である。更に加えて、このヌクレオチド固定化担体は、ベクターにcDNA配列を一定の方向で挿入する改良法も提供する。本発明は、また不溶性担体にポリヌクレオチドを結合する新しい方法も提供する。

【特許請求の範囲】

1. 次の工程：

(a) 少なくとも一つの、mRNAのポリAテイルに相補的な配列を含むポリヌクレオチドを、不溶性担体に結合させて、ヌクレオチド固定化担体をつくる工程；

(b) 上記ヌクレオチド固定化担体に、ポリAテイルをもつmRNA含有サンプル液を加える工程；

(c) 上記mRNAのポリAテイルと、ポリAテイルに相補的な配列をハイブリダイズさせる工程；

(d) 上記mRNAを鋳型として、mRNAに相補的なアンチセンスcDNAを製造する工程；及び

(e) そのアンチセンスcDNAに相補的なセンスcDNAを製造する工程；を含むds-cDNA固定化担体を製造する方法。

2. ポリヌクレオチドが、少なくとも一つのRNAプロモーターを更に含む請求項1の方法。

3. サンプル液が細胞溶解液を含む請求項1の方法。

4. 工程(c)が、上記担体とサンプル液のインキュベーションを含んでなり、第1の液相と固相を生成させるものである、請求項1の方法。

5. 更に第1の液相を除去する工程を含む請求項4の方法。

6. 工程(d)が次の工程：

逆転写酵素、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む第1の反応混合物を上記固相に加える工程；及び

上記固相と第1の反応混合物をインキュベートする工程；を含む請求項4の方法。

7. 工程(e)が次の工程：

RNase、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む第2の反応混合物を、インキュベートされた固相に加える工程；

その固相をインキュベートし、第2の液相を生成させる工程；及び

その第2の液相を除去する工程；
を含む請求項6の方法。

8. 次の工程：

- (i) 請求項1の方法により ds-cDNA固定化担体を製造する工程；
- (ii) 上記担体から液体を除去する工程；及び
- (iii) その ds-cDNA固定化担体を貯蔵する工程；

を含む ds-cDNAの貯蔵方法。

9. 次の工程：

(i) 担体に固定される ds-cDNAは、更にRNAプロモーターを付加的に含んでいる ds-cDNA固定化担体を、請求項1の方法により製造する工程；及び

(ii) そのプロモーターからアンチセンスmRNAを製造する工程；を含む固相担体上でアンチセンスmRNAを製造する方法。

10. 工程(c)は、上記担体とサンプル液をインキュベートして、第1の液相と固相を生成させる工程を含み、そして、工程(ii)は次の工程：

上記固相に、RNAポリメラーゼ、ATP、CTP、GTP及びUTPを含む反応混合物を添加する工程；

上記固相と反応混合物をインキュベートする工程；及び

上記固相と反応混合物を加熱し、アンチセンスmRNAを含む液相を生成させる工程；

を含む請求項9の方法。

11. 添加されるATP、CTP、GTP又はUTPのうちの、少なくとも一が標識されたものである、請求項10の方法。

12. 更に次の工程：

アンチセンスmRNAを含む液相を得る工程；及び

アンチセンスmRNAを含む液相をDNaseで処理する工程；

を付加的に含む請求項10の方法。

13. 次の工程：

- (a) 少なくとも一つの、mRNAのポリAテイルに相補的な配列、少なくとも

一つのRNAプロモーター、及び少なくとも一つの制限酵素認識サイトを含有するポリヌクレオチドを、不溶性担体に結合させて、ヌクレオチド固定化担体をつくる工程；

(b) 上記ヌクレオチド固定化担体に、ポリAテイルをもつmRNA含有サンプル液を加える工程；

(c) 上記mRNAのポリAテイルと、ポリAテイルに相補的な配列をハイブリダイズさせる工程；

(d) 上記mRNAを鋳型として、上記mRNAに相補的なアンチセンスcDNAを製造する工程；及び

(e) 上記アンチセンスcDNAに相補的なセンスcDNAを製造しつつ、上記担体に固定されたds-cDNAを製造する工程；

(f) 不溶性担体に固定化されたRNAプロモーターとは異なる第2のRNAプロモーター、あるいは、上記担体に固定化された制限酵素認識サイトとは異なる第2の制限酵素認識サイトの、少なくともいずれかを含む二本鎖アダプターを、上記ds-cDNAに加える工程；

(g) 上記ds-cDNAを、上記第2の制限酵素認識サイトを認識する制限酵素で消化する工程；

(h) 上記第2のRNAプロモーターを用いて、RNAを製造することにより、DNA/RNA二本鎖を製造する工程；及び

(i) DNA/RNA二本鎖を変性して、センスmRNAを含む液相を生成する工程；

を含む固相担体上でセンスmRNAを製造する方法。

14. 工程(f)が次の工程：

上記固相に、DNAリガーゼ、上記二本鎖アダプターを含む反応混合物を加える工程；及び

上記固相と反応混合物をインキュベートする工程；を含む請求項13の方法。

15. 工程(h)が次の工程：

上記固相に、ATP、CTP、GTP、UTP及び第2のRNAプロモーター

と反応するRNAポリメラーゼを含む反応混合物を添加する工程；及び
上記固相と反応混合物をインキュベートし、DNA/RNA二本鎖をつくる工程；
を含む請求項13の方法。
16. 添加されるATP、CTP、GTP及びUTPのうちの、少なくとも一が標識されてなる、請求項15の方法。
17. 工程(i)が、上記DNA/RNA二本鎖を加熱することを含む請求項13の方法。
18. 更に次の工程：
工程(i)の液相を採取する工程；及び
その液相をDNaseで処理する工程；
を付加的に含む請求項13の方法。
19. 次の工程：
(a) 上記ヌクレオチド固定化担体に、mRNA含有サンプル液を加える工程；
(b) 上記サンプル液と担体をインキュベートし、第1の液相と固相を生成させる工程；
(c) 液相を除去する工程；
(d) 上記固相に、逆転写酵素、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む第1の反応混合物を加える工程；
(e) 上記第1の反応混合物と固相をインキュベートする工程；
(f) 上記固相に、RNase、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む第2の反応混合物を添加する工程；
及び
(g) 上記第2の反応混合物と固相をインキュベートする工程；を含み、不溶性皿に、mRNAのポリAテイルに相補的な配列を少なくとも一つ含むポリヌクレオチドが固定された、ヌクレオチド固定化担体を用いる、ds-cDNAを製造する方法。
20. 工程(d)において添加されるdATP、dCTP、dGTP又はdTTPのうちの、少なくとも一が標識されたものである、請求項19の方法。

21. 請求項19の方法により、ds-cDNAを製造する工程；

第2の反応混合物と固相を加熱して、センスss-cDNAを含む第2の液相をつくる工程；及び

その第2の液相を採取する工程；

を含むセンスss-cDNAを製造する方法。

22. 請求項19の方法により、ds-cDNAを製造する工程；

第2の反応混合物と固相を加熱して、センスss-cDNAを含む第2の液相をつくる工程；及び

その固相を採取する工程；

を含むアンチセンスss-cDNAを製造する方法。

23. 次の工程：

(a) 請求項1の方法により、センスcDNAとアンチセンスcDNAが液相でds-cDNA二本鎖を形成する、ds-cDNA固定化担体を製造する工程；

(b) 上記ds-cDNAを変性させる工程；及び

(c) 上記液相を採取する工程；

を含むセンスss-cDNAを製造する方法。

24. 次の工程：

(a) mRNAのポリAテイルに相補的な配列を、少なくとも一つ含むds-cDNAの一方の鎖を、不溶性担体に固定して、ds-cDNA固定化担体を液相中に製造する工程；

(b) 上記ds-cDNA固定化担体を変性させる工程；及び

(c) その液相を採取する工程；

を含むセンスss-cDNAを製造する方法。

25. 次の工程：

(a) 請求項1の方法により、センスcDNAとアンチセンスcDNAが液相でds-cDNA二本鎖を形成する、ds-cDNA固定化担体を製造する工程；

(b) 上記ds-cDNAを変性させる工程；及び

(c) 上記液相を除去し、上記アンチセンスss-cDNAを含む固相とする工程；

を含むアンチセンス ss-cDNAを製造する方法。

26. ds-cDNAが制限酵素認識サイトを含み、かつ、その制限酵素認識サイトを認識する制限酵素で、そのアンチセンス ds-cDNAを消化することを含む請求項25の方法。

27. 次の工程：

(a) 請求項1の方法により、不溶性担体に固定されたポリヌクレオチドが更に第1の制限酵素認識サイトを含む ds-cDNA固定化担体を製造し；

(b) その ds-cDNAに、上記不溶性担体に固定されたポリヌクレオチドの制限酵素認識サイトとは異なる、第2の制限酵素認識サイトを含む二本鎖アダプターを加える工程；

(c) 上記 ds-cDNAを、上記第1の制限酵素認識サイトを認識する制限酵素、及び上記第2の制限酵素認識サイトを認識する制限酵素で消化し、第1の末端に第1の粘着末端をもつ非固定 ds-cDNAを生成させる工程；

(d) 非固定 ds-cDNAを、その第1の末端で、上記第1の粘着末端に相補的な配列をもっているベクターに連結する工程、を含む cDNA配列を特定の方向でベクターに挿入する方法。

28. 工程(c)の非固定 ds-cDNAが、更に第2の末端で粘着末端を生じ、かつ、工程(d)のベクターが更に、第2の末端で上記第2の粘着末端に相補的な配列をもっている、請求項27の方法。

29. 次の工程：

第1の一本鎖ポリヌクレオチドに、その第1のポリヌクレオチドに相補的な第2の一本鎖ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ二本鎖を形成させて、ポリヌクレオチドのプリン塩基を更なる反応から保護する工程；

その第1のポリヌクレオチドの5'末端をマレイミド化合物と反応させて、5'末端にマレイミド基をもつポリヌクレオチドをつくる工程；

第1のポリヌクレオチドの5'末端でマレイミド基にスルフヒドリル基を反応する工程；

を含んでなり、少なくとも一つのプリン塩基をもつ第1の一本鎖ポリヌクレオチドを、表面にスルフヒドリル基をもつ不溶性担体に固定化する方法。

30. 更に、上記二本鎖コンプレックスを変性させることを含む請求項29の方法。

31. 上記マレイミド化合物がスルフォーSMCCを含む請求項29の方法。

32. 上記スルフヒドリル基が、不溶性担体上で、

上記アミノ基をSATAと反応させ、反応コンプレックスを生成させる反応；及び、

その反応コンプレックスをヒドロキシルアミンで脱アセチル化する反応；を含む方法により、担体表面アミノ基から製造されるものである、請求項29の方法。

33. 更に、上記担体を第一級アミン化合物で処理することを含む請求項29の方法。

34. (a) 不溶性皿；及び

(b) mRNAのポリAテイルに相補的な配列を少なくとも一つ、RNAプロモーターを少なくとも一つ、及び制限酵素認識サイトを少なくとも一つ含むポリヌクレオチドを、上記不溶性皿に固定されたポリヌクレオチド；を含むヌクレオチド固定化担体。

35. 上記ポリヌクレオチドが、30～100ヌクレオチドを含む請求項34のヌクレオチド固定化担体。

36. 不溶性皿がマイクロタイタープレートを含む請求項34のヌクレオチド固定化担体。

37. マイクロタイタープレートが少なくとも二つのウェルを含み、そのウェル各々は相異なる固定化ポリヌクレオチドを含む請求項36のヌクレオチド固定化担体。

38. ヌクレオチドが、EcoRI、NotI、SmaI及びSalIから成る群から選ばれる制限酵素の認識サイトを含む請求項34のヌクレオチド固定化担体。

39. ポリヌクレオチドが、T7RNAプロモーター又はSP6RNAプロモーターを含む請求項34のヌクレオチド固定化担体。

40. ポリヌクレオチドが、mRNAのポリAテイルに相補的な配列としてポリ

d Tを含む請求項34のヌクレオチド固定化担体。

41. ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13及びSEQ ID NO:14から成る群から選ばれる配列を含む請求項34のヌクレオチド固定化担体。

42. ポリヌクレオチドが、少なくとも二つのRNAプロモーターを含む請求項34のヌクレオチド固定化担体。

43. ポリヌクレオチドが、少なくとも二つの相異なるRNAプロモーターを含む請求項42のヌクレオチド固定化担体。

44. ポリヌクレオチドが、T7 RNAプロモーター及びSP6 RNAプロモーターを含む請求項42のヌクレオチド固定化担体。

【発明の詳細な説明】

ポリヌクレオチド固定化担体

発明の背景

大部分の生物は、遺伝情報がDNAの形で保存されている。このDNAはメッセンジャーRNA (mRNA) に転写され、次いで、このmRNAはタンパク質に翻訳される。真核細胞においては、ゲノムDNAが成熟mRNAにプロセシングされるときに、通常、いくつかの遺伝情報の欠落が起こる。この欠落はイントロン/エキソン、すなわち、RNAスプライシングもしくはタンパク質のプロセシングによって起こる。したがって、タンパク質構造の遺伝的基礎はゲノムDNAよりもむしろmRNAを使って研究するほうが有利である。

しかし不幸なことに、mRNAは非常に不安定で、種々のリボヌクレアーゼ (RNA分解酵素、以下、RNAseという。) により、容易に分解を受け、実験が困難である。そこで、多くの研究者達は、mRNA分子のDNAコピー (cDNA) を研究の材料に使ってきた。これらコピーは、ターゲットのmRNAを鋳型として、一本鎖DNAを生産できるレトロウィルスから分離された逆転写酵素を用いてつくる。

二本鎖DNA (ds-cDNA) は一本鎖cDNA (ss-cDNA) よりも一般的には安定である。DNAポリメラーゼを用いて、ss-cDNAをds-cDNAへ変換する方法は、この技術分野でよく知られている。ds-cDNA上に貯えられた遺伝子情報は、種々のプロトコールで、例えば、ds-cDNAを発現ベクターに挿入し、次いでこの組換えベクターを種々の細胞に導入して、利用される。これらのベクターに存在するプロモーターや制限部位は、ds-cDNAの転写及び翻訳の研究の道具として利用できる。

ポリペプチドをコードする配列を含むmRNA (すなわち、センスmRNA) の転写に関与するベクターのプロモーターの利用に加えて、相補的cDNA鎖から転写されたアンチセンスmRNAをつくることもできる。アンチセンスmRNAは、タンパク質の生物学的機能や、その作用が未だ知られていないmRNAを

理解する有用な道具である。アンチセンスRNA分子はターゲットmRNAと共

にアニールさせ、翻訳を阻害することによって、特異的タンパク質の生産をブロックする。それゆえ、この型の翻訳阻害は種々の病状に関連するいろいろな遺伝子産物の研究に重要であろうと容易に想定される。

ss-cDNAは、DNAポリメラーゼの触媒作用によるds-cDNAの合成の基礎として使用されるほか、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（以下、PCRという。）の鋳型として使用できる。この方法で、反対向きの複数のヌクレオチド・プライマーと熱安定性DNAポリメラーゼを用いて、特異的な遺伝子配列を迅速に増幅できる。アニーリングとDNA合成のサイクルを繰り返すことにより、ターゲット遺伝子のコピーが速やかにつくられる。こうして、センスss-cDNAは、それに対応するds-cDNAのセグメントを特異的に増幅させるため使われる。

現在知られている、ds-cDNA生産の一つのプロトコールは、Sambrookらの「モレキュラー・クローニング 実験マニュアル、第2版」（Cold Spring Harbor, NY, 1989）（以下、「モレキュラー・クローニング」という。）に記載された液相法がある。このマニュアルを完全に開示するため、参考文献がここに取り込まれている。液相法では、アンチセンスss-cDNAは、mRNAから逆転写酵素の作用、それに続くRNaseによるmRNA分解によってつくられる。ds-cDNAは、DNAポリメラーゼを用いて、残ったアンチセンスss-cDNAからつくられる。逆転写酵素に続くDNAポリメラーゼ反応は、逆転写酵素が自己プライミングするループ構造をその3'末端にもつss-cDNAを残していくので、特異的プライマーを必要としない。

液相法では、生じたds-cDNAは分子の方向を決定するマーカーが含まれていない。したがって、新しくつくられたds-cDNAクローンは、その50%が転写方向が誤っているであろうから、容易にはクローニング・ベクターへ挿入できない。それゆえ、ベクターへ正しい方向で挿入し、mRNAを迅速にクローニングする方法が、望まれている。

ss-cDNAあるいはds-cDNAは、固相を用いることによってもつくられる（I. Raineri et al., Nucleic Acids Research, 19:4010, 1991）。固相

法では、通常、多孔性ビーズに固定されたポリデオキシチミジル酸（ポリdT）がmRNAのポリアデニル酸（ポリA）テイルと相補し結合する。次いで、アンチセンス s-s-cDNAが、結合されたmRNAから逆転写酵素によってつくられる。鋳型のRNAが消化分解されたのち、第2のcDNA鎖がDNAポリメラーゼによって合成される。生じたd-s-cDNAは、ビーズに固定化されたアンチセンス鎖をもっている。

しかし固相法においては、d-s-cDNA産物は不溶性担体から切り離すことができない。この問題を避けるためには、d-s-cDNA産物を加熱し、担体に固定されたd-s-cDNAからs-s-cDNAを遊離させ、このs-s-cDNAを用いて、d-s-cDNAがPCRで合成される。しかし、これは反応にもう一つのステップが加わることを意味し、PCR反応ごとに適当な一揃いのプライマーが必要となる。

それゆえ、単離されたmRNAから、結合型ではないd-s-cDNAクローンを創る単純な方法が要求されている。本発明の方法は、結合型ではなく、方向性が正しい、クローン創生可能な産物を有利に提供するであろう。

また、cDNAクローンからmRNAを合成できる種々の方法も知られており、その一つは液相法である（S. Shichijo ら：J. Neurosci. Res., 30:316-320, 1991）。この方法においては、RNAプロモーターをもつベクターにd-s-cDNAが挿入される。ベクターは次いで、制限酵素で消化されて直鎖状となり、RNAポリメラーゼの作用でmRNAが合成される。合成されたmRNAは、鋳型DNAを除去するためDNaseで処理される。必要ならばこのとき、新たに合成されたRNAの末端に、ターミナル・トランスフェラーゼ及びdATPを用いてポリアデニル酸テイルが付加される。

mRNAの固相合成法もまた、よく知られている。その一つは、Hironori Terada（寺田博之）らの「固定化DNAによる転写の動的解析」（Biophysics（生物物理）、31:49-52, 1991）に書かれている。この方法では、DNA配列が制限酵素によってバクテリオファージ・ラムダのゲノムから消化されて、粘着末端をもつランダムDNA断片が生じる。これをT4DNAポリメラーゼを用い、ビオチン化dUTPによって粘着末端を満たし平滑化する。T4DNAポリメラーゼ

によ

るDNA合成のあいだ、ビオチン化dUTPがハイブリダイズするように、むき出しのdAヌクレオチドをもつ粘着末端が残るように、制限酵素が選ばれる。ラムダ配列が次に、アビジンをもつアクリルアミド担体に固定化される。mRNAが天然のラムダ・プロモーター配列をもつ配列から、T7RNAポリメラーゼ又はSP6RNAポリメラーゼを用いて、合成される。この系は、バクテリオファージ・ラムダにおける転写の速度論的解析の研究のため設計されたものである。

mRNAの液相及び固相合成法はいずれも、欠点をもっている。液相合成法は、RNAプロモーター含有のベクターの使用が必要な上、挿入の後はベクターは、直鎖状の配列に変換されなければならない。固相合成法は、いつも完全な遺伝情報を提供するとは限らない。なぜなら、この情報は固定化されたゲノムDNAの情報であってmRNAの情報ではないからである。それゆえ、改良されたmRNAの合成方法が望まれている。

Stammらは、固相担体にアミノ結合を介して共有結合されたオリゴヌクレオチドは、PCRの実験に便利に使用できると述べている(Nucleic Acids Res., 19:1350, 1991)。しかし、Stammらが述べているテクニックは、cDNAやRNAの生産を特異的に提供するものではない。そのうえ、担体に共有結合されたオリゴヌクレオチドを除くメカニズムについては何ら提供されていない。

発明の概要

本発明は、遺伝子の保存や分析に有用なポリヌクレオチド固定化担体、そのポリヌクレオチド固定化担体を用いる遺伝子の保存方法、並びに、ss-cDNA、ds-cDNA、センスmRNAもしくはアンチセンスmRNAの製造方法に関する。

本発明のひとつの局面は、不溶性担体とその担体に固定されるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド固定化担体を提供することである。ここで固定されるポリヌクレオチドは、少なくとも、mRNAのポリAテイルに相補的なひとつの配列を含む。このポリヌクレオチド固定化担体は、ds-cDNAの製造や、ま

たセンスもしくはアンチセンス cDNA の製造を含む、いろいろな方法に有用である。このポリヌクレオチド固定化担体は、また、センスもしくはアンチセンス

mRNA の製造にも有用である。更に、このポリヌクレオチド固定化担体は、cDNA 配列をベクターに方向性正しく挿入する改良法も提供する。本発明は、また、不溶性担体にポリヌクレオチドを結合する新しい方法も含んでいる。

本発明は、mRNA のポリ A テイルに相補的な配列、例えばオリゴ dT、を含むポリヌクレオチドに焦点を当てている。本発明のひとつの好ましい局面においては、このポリヌクレオチドは、更に制限酵素の認識サイト及び mRNA のプロモーター配列を含むことができる。ポリヌクレオチドは、通常、マイクロタイタープレートのような不溶性皿に固定される。本発明のひとつの好ましい形態におけるマイクロタイタープレートは、少なくとも、二つのウェルをもち、各々には異なるポリヌクレオチドが固定される。本発明のポリヌクレオチド固定化担体は、全体長さをもつ ds-cDNA、センスもしくはアンチセンス ss-cDNA、及びセンスもしくはアンチセンス mRNA の製造に使用できる。更に、ポリヌクレオチド固定化 ss-cDNA は長期に安定であって、ds-cDNA 又は mRNA の製造に何度もこれを繰り返して使用できる。

本発明のひとつの実施態様は、不溶性皿、好ましくはマイクロタイタープレートにポリヌクレオチドを固定化させた、ポリヌクレオチド固定化担体である。固定化されたポリヌクレオチドは、少なくとも、mRNA のポリ A テイルに相補的なひとつの配列、例えば、ポリ dT を含む。あるひとつの好ましい実施態様においては、このポリヌクレオチドは、少なくともひとつの制限酵素サイトを含む。更に好ましい実施態様では、このポリヌクレオチドは、制限酵素サイトに加え、RNA プロモーターをもっている。本発明のもうひとつの実施態様は、少なくともひとつの RNA プロモーターを含む不溶性担体に、好ましくはポリヌクレオチドを結合させた、ポリヌクレオチド固定化担体である。最も好ましい実施態様は、T7 もしくは SP6 RNA プロモーターのいずれかを含むものである。

本発明の別の実施態様は、不溶性担体と、少なくともひとつの制限酵素サイトを含む固定化されたポリヌクレオチドから成る、ヌクレオチド固定化担体である

。好ましい制限酵素は、EcoRI、NotI、SmaI及びSalI等である。好ましいポリヌクレオチドの配列はSEQ ID NO: (配列番号) 4、13又は14である。好ましい実施態様では、固定化ポリヌクレオチドは30～100ヌクレオ

チドの長さである。

本発明の更に別の実施態様では、不溶性担体、好ましくは不溶性皿と、それに結合されたds-cDNAから成るds-cDNA固定化担体の、そのds-cDNAの少なくとも一方の鎖は、mRNAのポリAテイルに相補する配列を少なくとも含んでいる。本発明の好ましい実施態様においては、ds-cDNAの少なくとも一方の鎖は、RNAプロモーターをもっており、更に好ましくは、ds-cDNAは少なくとも二つの異なるRNAプロモーターを含んでいる。もっと好ましくは、これらのプロモーターは、T7もしくはSP6 RNAプロモーターである。ds-cDNA固定化担体の別の実施態様においては、少なくとも一つの制限酵素認識サイトは、その配列に組み込まれている。

本発明の別の実施態様は、ポリヌクレオチド、好ましくは、少なくとも一つのRNAプロモーターをもつポリヌクレオチドを不溶性担体に結合させて得られる、ds-cDNA固定化担体の製造方法である。このポリヌクレオチドは、好ましくはmRNAのポリAテイルに相補する配列を少なくとも一つもっており、ヌクレオチド固定化担体を形成する。そこへ、細胞溶解液のようなポリAテイルのmRNA含有溶液を加え、mRNAのポリアデニル酸テイル (ポリAテイル) を固定化ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズさせ、更に好ましくは、担体と溶液をインキュベートすると、最初の液相及び固相が生じる。上記方法の更に好ましい実施態様においては、最初の液相はインキュベーションの後、除かれる。ハイブリダイゼーションののち、アニール処理されたmRNAに相補的なアンチセンスcDNAがつくられ、次いで、センスcDNAがつくられる。

上記方法の更に好ましい実施態様は、最初の反応混合物に逆転写酵素、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを用い、固相と最初の反応混合物をインキュベートすることを必要とする。インキュベーションののち、RNAse、DN

Aポリメラーゼ、DNAリガーゼ、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む第2の反応混合物が、液相に加えられる。そのうち、固相をインキュベートし、第2の液相をつくり、そのうち、この第2の液相を除去する。

本発明の更に別の実施態様は、ds-cDNA固定化担体をつくったのち担体から液を除去し、ds-cDNA固定化担体を保存する、ds-cDNAの保存

方法である。

本発明の更に別の実施態様は、不溶性担体に固定化されたds-cDNAが更にRNAプロモーターをもつように、ds-cDNA固定化担体を上記のようにしてつくることにより、担体上にアンチセンスmRNAを製造する方法である。プロモーターが転写を始めるような試薬を含むサンプル液を加えると、アンチセンスmRNAが生産される。アンチセンスmRNAの好ましい生産方法では、担体とサンプル液をインキュベートすることによって、最初の液相と固相をつくり、次いで以下のステップで反応を始める。

1) 固相に、RNAポリメラーゼ、ATP、CTP、GTP及びUTPと共に、望ましくは、ラベルされたdNTP類の一つを含む反応混合物を加える。

2) 液相と反応混合物をインキュベートし、次いで、固相と反応混合物を加熱し、アンチセンスmRNAを含む液相をつくる。

そのうち、液相を取得し、DNaseで処理することにより、反応をつづけることが望ましい。

本発明の別の実施態様は、固相担体上にセンスmRNAを以下のステップによって生産する方法に向けられている。

(a) mRNAのポリAテイルに相補する配列を少なくとも一つもっており、RNAプロモーターを少なくとも一つもっており、更に制限酵素認識サイトを少なくとも一つもっているポリヌクレオチドを、不溶性担体に結合させ、ヌクレオチド固定化担体をつくる；

(b) ヌクレオチド固定化担体にポリAテイルをもつmRNA含有サンプル液を加える；

(c) mRNAのポリAテイルを相補塩基配列とハイブリダイズさせる；

(d) mRNAに相補的なアンチセンスcDNAをつくるため、鋳型としてmRNAを用いる；

(e) アンチセンスcDNAに相補的なセンスcDNAをつくる。この際、ds-cDNA分子は担体に固定されている；

(f) ds-cDNAに、二本鎖のアダプターを加える。この二本鎖アダプターは、不溶性担体に固定化されたポリヌクレオチドとは異なる第2のRNAプロ

モーター、及び不溶性担体に固定化されたポリヌクレオチド上の制限酵素認識サイトとは異なる第2の制限酵素認識サイトの、少なくとも一つを含んでいるものである。オプションとして、DNAリガーゼ及び二本鎖アダプター含有の反応混合物を加えてもよい；

(g) 第2の制限酵素認識サイトを認識する制限酵素で、ds-cDNAを消化する；

(h) 第2のRNAプロモーターを用いて、RNAを転写し、DNA/RNAハイブリッドをつくる。この反応は固相に、ATP、CTP、GTP、UTP、及び第2のRNAプロモーターと反応するRNAポリメラーゼを加え、そののち、固相と反応混合物をインキュベートし、DNA/RNAハイブリッドをつくる。オプションとして、前記のdNTP類の一つがラベルされていてもよい。

(i) 好ましくは加熱によって、DNA/RNAハイブリッドを解離させ、センスmRNAを含有する液相をつくる。液相をDNaseで処理してもよい。

本発明の他の実施態様は、以下の方法によるds-cDNAの製造方法に向けられている。

1. ヌクレオチド固定化担体にポリAテイルをもつmRNA含有サンプル液を加える；

2. サンプル液と担体をインキュベートし、第1の液相と固相をつくる；

3. 第1の液相を除く。

4. 逆転写酵素、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPと共に、前記のラベルされたヌクレオチドを含む第1の反応混合物を、固相に加える；

5. 第1の反応混合物と固相をインキュベートする；

6. RNase、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、dATP、dCTP、dGTP及びdTTP含有の第2の反応混合物を固相に加え；そして

7. 第2の反応混合物と固相をインキュベートする。

本発明の他の実施態様は、上記したような方法でds-cDNAをつくり、次いで第2の反応混合物と固相を加熱する、センスss-cDNAの製造方法である。このとき、センスss-cDNAを含む第2の液相が得られる。

本発明の他の実施態様は、上記したような方法でds-cDNAをつくり、次

いで第2の反応混合物と固相を加熱する、アンチセンスss-cDNAの製造方法である。このとき、センスss-cDNAを含む第2の液相と、固相を含むアンチセンスss-cDNAが得られる。

本発明の他の同様な実施態様の一つは、上記したようなds-cDNA固定化担体を用いる、センスcDNAの製造方法である。センスcDNAとアンチセンスcDNAが液相で二本鎖cDNAを形成したのちに、そのds-cDNAは変性され、液相が得られる。

本発明の他の同様な実施態様の一つは、センスss-cDNAの製造方法に向けられている。この方法は、液相でのds-cDNA固定化担体の生産を含むもので、そこでは、ds-cDNA鎖の一方の鎖が不溶性担体に固定され、ds-cDNA鎖の一方の鎖は、mRNAのポリAテイルに相補的な配列を少なくとも一つ含んでいる。その後、ds-cDNA固定化担体を変性し、液相を得る。

本発明の他の実施態様の一つは、上記したように、ds-cDNA固定化担体を製造することによる、アンチセンスss-cDNAの製造方法であり、そこでは、センスcDNAとアンチセンスcDNAは液相で二本鎖を形成している。このds-cDNAは、この方法で自由に選択して開裂できる制限酵素サイトを含むほうが好ましい。ds-cDNAを変性させ、液相を除去し、得られる固相はアンチセンスss-cDNAを含むであろう。

本発明の他の実施態様の一つは、ベクターに特定の方向性をもたせて、cDNAを挿入するcDNAベクターの操作方法である。一つの手順を以下に示す。

(a) 上記したように、ds-cDNA固定化担体をつくる。そこでは、不溶

性担体に固定されたポリヌクレオチドには、第1の制限酵素認識サイトが付加されて含まれている；

(b) そのds-cDNAに二本鎖アダプターを加える。この二本鎖アダプターは、不溶性担体に固定化されたポリヌクレオチド上の制限酵素認識サイトとは異なる第2の制限酵素認識サイトを含んでいる；

(c) そのds-cDNAを、第1の制限酵素認識サイトを認識する制限酵素、及び第2の制限酵素認識サイトを認識する制限酵素で消化して、第1の粘着末端をもち、好ましくは更に第2の粘着末端をもつ、遊離型のds-cDNAを生じ

させ；

(d) 遊離型のds-cDNAを、第1の粘着末端に対して相補的配列をもち、好ましくは更に第2の粘着末端に対しても相補的配列をもつベクターに挿入する。

本発明のもうひとつの局面は、表面にSH基をもつ不溶性担体に、少なくとも一つのプリン塩基をもつ第1の一本鎖ポリヌクレオチドを、その第1の一本鎖ポリヌクレオチドに第2の一本鎖ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせて二本鎖コンプレックスを形成させるたのちに、これを固定化する方法に向けられている。担体は第一級アミン化合物で任意に処理される。上記コンプレックスは、このとき、プリン塩基を副反応から保護する。その後、第1のポリヌクレオチドの5'を、好ましくは二本鎖コンプレックスを変性後に、マレイミド化合物と反応させると、5'末端にマレイミド基をもつポリヌクレオチドが生じる。一つの任意に選ばれるマレイミド化合物はスルフォ-SMCCである。反応が進むと、不溶性担体に結合されたSH基に、第1のポリヌクレオチドの5'末端と反応したマレイミド基が結合する。

上記の不溶性担体へのポリヌクレオチドの固定化方法において、好ましい一つの実施態様では、不溶性担体上でアミン残基とスクシンイミジル-S-アセチルチオ酢酸(SATA)を反応させ、反応コンプレックスを形成させることにより、SH残基がアミン残基からつくられる。反応コンプレックスの脱アセチル化は

ヒドロキシルアミンで行われる。

図面の簡単な説明

図 1 は、マレイミド法による不溶性担体上への第 1 のポリヌクレオチド・プローブの固定化手順を示す。

図 2 は、カルボジイミド法による不溶性担体上への第 1 のポリヌクレオチド・プローブの固定化手順を示す。

図 3 は、本発明における、ポリヌクレオチド固定化担体からのセンス s s - c DNA、アンチセンス mRNA 及びセンス mRNA の合成手順の原理を示す。

図 4 は、本発明による、合成された G s 蛋白のアンチセンス mRNA (A) 及びセンス mRNA (B) のアガロースゲル電気泳動のポラロイド写真を示す。

図 5 は、本発明における、ポリヌクレオチド固定化担体からの G s 蛋白の s s - c DNA からの、PCR で増幅された d s - c DNA のアガロースゲル電気泳動のポラロイド写真を示す。(A)、(B) 及び (C) は、それぞれ同じプレートからの、第 1、第 2 及び第 3 の合成を示す。

図 6 は、本発明による、ヒトの末梢血白血球からの j u n オンコジーン、PCR で増幅された d s - c DNA のアガロースゲル電気泳動のポラロイド写真を示す。

図 7 は、本発明による、ヒトの末梢血白血球からの種々の遺伝子の、PCR で増幅された d s - c DNA のアガロースゲル電気泳動のポラロイド写真を示す。

(A) 及び (B) は、PCR のアニーリングの温度がそれぞれ、45℃及び55℃である。

図 8 は、本発明による、PCR で増幅された G s 蛋白の d s - c DNA のアガロースゲル電気泳動のポラロイド写真を示す。

発明の詳細な説明

定義

よく知られた以下の略号を使用した。

A : アデニン

C : シトシン

G : グアニン

T : チミン

U : ウラシル

d A T P : デオキシアデノシン三リン酸

d C T P : デオキシチジン三リン酸

d G T P : デオキシグアノシン三リン酸

d T T P : デオキシチミジン三リン酸

本発明において、「不溶性皿」とは、オリゴヌクレオチドの通常の生産に使用され、水性緩衝液もしくは溶液に不溶性の、窪みをもった、もしくは平らな担体

を意味する。本願で使用される不溶性皿は、液体を保持できるものが好ましい。したがって、好ましい実施態様はマイクロタイター・ディッシュ、プラスチック・プレート又はナイロン膜であって、例えば、プラスチック・ビーズや他の不溶性ビーズではない。

制限エンドヌクレアーゼ酵素で特異的に消化されるヌクレオチド配列は、ここでは、「制限酵素認識サイト」として定義される。そのような認識サイトは数多く知られており、ある与えられた配列は1以上の認識サイトを持っていることもありうる。例えば、その配列がN o t Iに対する認識サイトとE c o R Iに対する認識サイトの両方を含むような場合である。

「RNAプロモーター」は、ここでは、RNAポリメラーゼにより認識され、そこから下流にヌクレオチドの転写が始まるヌクレオチド配列を意味する。例えば、T 7 RNAプロモーター (SEQ ID NO:1) は下記に示される。

5' - A A T A C G A C T C A C T A T A G - 3'

別のもう一つのRNAプロモーターはS P 6プロモーター (SEQ ID NO:2) で、下記に示される。

5' - C A T T T A G G T G A C A C T A T A G A A - 3'

「不溶性担体」とはここでは、本願発明の範囲内において操作するとき、操作をしているあいだに使用溶液に実質的に溶解せず、また加熱過程で融解もしくは溶解しない物質を意味する。そのような不溶性担体の例として、不溶性皿（プラ

スチック製マイクロタイタープレート、ガラス製マイクロタイタープレート、又はナイロン膜を含む) があり、また、アガロースやプラスチック・ビーズも含む。

本願発明において、センスmRNAとは遺伝情報と同等なmRNAを意味し、一方、アンチセンスmRNAとはセンスmRNAに相補的なポリヌクレオチドを意味する。センスss-cDNAは、センスmRNAの遺伝情報と同等な遺伝情報を含んでいる。ただし、そのcDNAにおいては、mRNAのウラシルはチミンに置き代わり、ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであってリボヌクレオチドではない。

本発明で用いられる水は、その中のRNase活性を実質的に減少させるために、好ましくは、ジエチルピロカーボネート(DEPC)で処理される。水のD

EPC処理は、水に対してDEPCを0.1%加え、37℃で一晩インキュベート後、オートクレーブすることにより行う。

本発明の概観

本願発明を使用して、ds-cDNA、ss-cDNA、センス-mRNA及びアンチセンスmRNAが迅速、かつ有利にマイクロタイター・プレートのような不溶性皿(ID)の中で、固定オリゴヌクレオチド配列から合成される。このシステムの利点は、RNAが不溶性皿に固定されているとき、液を容易に交換できる点である。以前には、エタノール沈殿やそれに類似の操作は、液交換のたびに可溶性RNAを回収する必要があった。本発明の好ましい実施態様では、制限酵素サイト、RNAプロモーター配列及びポリdT配列は、共有結合でマイクロタイター・プレートのウェルに結合されている。細胞質のmRNAを含む細胞溶解液は、更に精製することなく、ウェルの中に注ぐことができる。好ましい実施態様においては、オリゴdTヌクレオチド鎖は、mRNAのポリAテイルと水素結合するであろう。mRNAがアニールによって、ターゲットに固定化されると、ハイブリダイゼーションの条件を妨害しない液の交換をすることができる。

一本鎖cDNAは、デオキシヌクレオチドと逆転写酵素を加えることにより、固定化mRNAから製造できる。二本鎖cDNAは、その反応液をDNAポリメ

ラーゼ及びデオキシオリゴヌクレオチドを含む反応液に交換すれば容易に製造できる。アンチセンスmRNAは、共有結合で付加されたオリゴヌクレオチド上のプロモーター結合サイトに向けられたRNAポリメラーゼを加えることにより、転写できる。更に、好ましくは、別の異なる制限酵素認識サイト及び第2のRNAプロモーター配列を含むアダプターを、そのds-cDNAの固定されていない方の末端に、有利に結合させることができる。

その後、センスmRNAは、結合されたアダプターに向けられたRNAポリメラーゼを加えることにより、速やかに容易に、転写される。一本鎖センスcDNAは、固定された一本鎖アンチセンスcDNAから、繰り返し合成できる。本発明は、基礎分子生物学と分析のみに有用な道具を提供するものではなく、種々の

疾患の分子診断及び治療にも有用である。

我々は、mRNAのポリAテイルに相補的な配列を少なくとも一つ含むポリヌクレオチドを不溶性担体に固定すると、理論及び応用分子生物学におけるヌクレオチド類合成や実験テクニックに意義のある有利性がもたらされることを見出した。これらの有利性の多くは、以下の発明の記述から明らかとなるであろう。

本発明の固定化ポリヌクレオチド

上で述べたように、固定化ポリヌクレオチドは、mRNAのポリAテイルに相補的な配列を含んでいる。そのような相補的配列は、オリゴdTやポリUである。その配列の長さは15～80塩基、更に好ましくは、30～100塩基である。

30～100merを含む種々の長さのポリヌクレオチドは、この分野で通常の知識をもつ技術者に知られたテクニックを用いて容易に合成できる。これらのテクニックは、mRNAのポリAテイルに相補的な配列、RNAプロモーター配列、及び／又は いろいろな制限酵素サイトをもった配列の合成方法を含む。DNA合成装置は、そのような合成を促進する。DNA合成装置の一つは、カリフォルニア州、ロサンジェルスのアプライド・バイオシステムズ社により生産されている。

本発明の好ましい実施態様において、mRNAのポリAテイルに相補的な配列

を少なくとも一つ含むポリヌクレオチドは、不溶性担体に結合されていて、ヌクレオチド固定化担体を構成する。これらの配列は、好ましくは30～100ヌクレオチド長さである。より好ましい実施態様では、固定化ポリヌクレオチドは、更にRNAプロモーター、及び／又は制限酵素認識サイトを含む。好ましくは、その5'末端は不溶性担体に固定され、その3'末端はmRNAのポリAテイルに相補する。

我々は、固定化のためのポリヌクレオチドを数多く使用してみた。一つの特に好ましい配列は、ポリdT配列、EcoRIとNotI認識サイト、及びT7プロモーター配列を含む配列である。この配列の使用は本明細書の実施例で多く記述されている。しかし、他の制限酵素認識サイト及びプロモーターを組合せても、我々は同様の結果を得ている。例えば、T7プロモーターと共にSmaI-SalIを使用しても、ここに記載の方法に重要な影響を及ぼさないようである。

我

々はまた、SP6プロモーターと共にEcoRI-NotIも使用した。

固定化方法

本発明の実行に当っては、ポリヌクレオチドは不溶性担体に固定される。不溶性担体へのポリヌクレオチドの固定化方法は種々用いることができ、その方法には共有結合法、イオン結合法、その他物理吸収法がある。しかし、共有結合法が好ましい。本発明のある実施態様においては、ポリヌクレオチドはその表面にカルボキシル基、アミノ基、又は水酸基のような官能基をもつマイクロタイター・プレートに固定される。その表面にカルボキシル基又は第一級アミノ基をもつプラスチック・プレート、あるいは、その表面にこれらの官能基をもたないが、後にこれらの官能基を付加したプラスチック・プレートも使用できる。好ましくは、その表面に既にカルボキシル基又は第一級アミノ基をもつプラスチック・プレートである。これらカルボキシル基又は第一級アミノ基をもつプラスチック・プレートの例は、「スミロン」マイクロプレートMS-3796FやMS-3696Fで、住友ベークライトから入手できる。

官能基をもつ不溶性担体にポリヌクレオチドを固定する好ましい方法では、ポ

リヌクレオチドの5'末端を担体の官能基に共有結合で結合させる。官能基へのポリヌクレオチドの結合に用いられる種々の共有結合法の多くは、使用できる。よく知られた、好ましい方法の例は、マレイミド法とカルボジイミド法がある。

マレイミド法は、図1に示したように、マレイミド基を含む物質と別のSH基を含む物質との反応を伴う。マレイミド法を用いて、不溶性担体にポリヌクレオチドの5'末端を結合させるため、ポリヌクレオチドの5'末端はマレイミド化合物と反応させる。好適なマレイミド化合物はスルフォスクシンイミディル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート(以下、スルフォ-SMCC)である。

SH基は、アミノ基をもつ担体とスクシンイミディル-S-アセチルチオアセテート(以下、SATA)との反応に続く、ヒドロキシラミンを用いる脱アセチル化により、担体に付与される。なお、スルフォ-SMCCやSATAは、ピアース社等のいくつかの会社から、市販品を容易に入手できる。生じた担体上のSH基は、ポリヌクレオチドの5'末端のマレイミド基と反応し、ポリヌクレオチ

ド固定化担体を形成する。マレイミド法を用いて我々が経験した一つの問題は、プレート上のSH基がポリヌクレオチドの5'末端のアミノ基と反応するばかりではなく、プリン塩基、すなわち、アデニン及びグアニンの第一級アミンとも反応することである。ポリヌクレオチドを5'末端でのみ固定化することを確認なものとするため、プリン塩基上のアミノ基は、固定化の前に相補的ポリヌクレオチドと対をつくらせて、保護しておく。固定化ののちに、相補的ポリヌクレオチドは加熱等の変性処理により除かれる。

カルボジイミド法は、図2に示されている。この方法は、アミノ基をもつカルボジイミドとカルボキシル基をもつ材料との反応を伴う。カルボジイミド化合物の一つの例は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(以下、EDC)である。カルボジイミド法でEDCを用いるためには、EDCを先ずアミノ基をもつEDC化合物に活性化しておかなければならない。これは、N-ヒドロキシルスルフォスクシンイミド(以下、スルフォ-NHS)と共に反応させて得られる。EDCもスルフォ-NHSも、ピアース社等のよく

知られた会社から、市販品を容易に入手できる。

カルボジイミド法で担体にポリヌクレオチドを結合させるには、好ましくは、予めカルボキシル基を結合させた担体を用いる。EDCは、スルホーNHSと反応させ活性化しておく。この活性化EDCは、その表面にカルボキシル基を含む担体と反応する。次いで、これをアミノ基をもつポリヌクレオチドの5'末端と反応させると、ポリヌクレオチド固定化担体が得られる。

我々は、不溶性担体上の活性化アミノ基又は活性化カルボキシル基の非特異的結合が、そのプレートに第一級アミン化合物、好ましくは、グリシンで処理することにより、効果的に減少もしくは除去されうることを見つけている。

他の多くの固定化方法、例えば、寺田らにより記述されているビオチン-アビジン系を用いる方法も使用できる（上掲書）。

検体の供試

本発明の好ましい方法においては、mRNAのポリAテイルに相補的な配列を

もつ不溶性担体に、mRNAを含む検体を供試する。検体のmRNAのポリAテイルは、固定化ポリヌクレオチドとハイブリダイズするように処置される。この処置は、この分野で通常の知識をもつ技術者によく知られたように、種々の因子に依存する温度によるインキュベーションにより達成される。これらの因子は、相補的ヌクレオチド配列の長さ、相補的ヌクレオチド配列の全塩基量のうちのグアニンもしくはシトシンの比（GC含量）、緩衝液中の塩化ナトリウム濃度、相補鎖におけるミスマッチの塩基数、及びヌクレオチドの型、等である。本発明の好ましい形においては、次の式がインキュベーションの温度の計算に使用できる。

$$T(\text{inc}) = 16.6 \times \log(M) + 0.41(\text{GC}) + 81.5 - 67.5/n - 15 (\text{°C})$$

上式において、Mは溶液中の塩化ナトリウム濃度（M）、GCはGC含量、nはヌクレオチド配列の長さ（ヌクレオチドの数）を示す。

インキュベーションの時間も、「モレキュラー・クローニング」のマニュアルに書かれている。

インキュベーションの時間は、好ましくは、1時間から一晩で、検体は、イン

インキュベーションの間ゆっくり振ったほうが好ましい。インキュベーションは、好ましくは好適な緩衝液中で行う。ノーザンブロットやドットブロット法においてRNAとDNAをハイブリダイズさせるときに用いる緩衝液と同じ緩衝液が使える。この緩衝液は、好ましくは、RNaseで汚染されないようにして、調製する。もし、RNaseが存在するようなら、その活性をできるかぎり抑えるようにコントロールしなければならない。RNaseを含まない緩衝液は、例えば市販品の「ファスト・トラック」（インヴィトロゲン社、サンジエゴ、カルフォルニア州）の商標で売られているmRNA精製用キットの中に、あるいは、後述の溶解用バッファーとして、入手できる。

上記したように、本発明で使用する水からRNase活性を除去するために、水は好ましくは、ジエチルピオカーボネート（DEPC）で処理される。好ましいDEPC処理は、水にDEPCを0.1%加え、37℃で一晩放置したのち、オートクレーブで滅菌する。

洗浄操作

インキュベーション後、好ましくは、検体の非結合成分を不溶性担体から洗いきる。適当な洗浄液は、インキュベーション用バッファーであり、あるいはmRNA精製用キットに含まれるバッファー等である。しかし、核酸の型に因っては、適当な溶液を使用することが好ましい。mRNAを捕捉したまま保持するための洗浄液は、好ましくは、1mM EDTA及び0.5M塩化ナトリウム含有の20mMトリスバッファー（DEPC処理水を使用）、pH7.5（以下、RNA洗浄液という。）を用いる。DNAをそのまま保持するための洗浄液は、好ましくは、1mM EDTA及び0.5M塩化ナトリウム含有の20mMトリスバッファー、pH7.5をオートクレーブし、これ（以下、DNA洗浄液という。）を用いる。

二本鎖cDNA固定化担体

本発明におけるds-cDNA固定化担体は、次のようにして得られる。ポリヌクレオチド固定化担体を、mRNA検体と混合し、固定化ポリヌクレオチドとmRNAのあいだでハイブリダイゼーションを起こさせる。次いで、逆転写酵素

を用いてmRNA鋳型からcDNAが合成される。mRNAは、好ましくは、RNase Hを用いて消化され、次いで、好ましくは、DNAポリメラーゼ、4つのdXTP類及びリガーゼの作用により、ds-cDNAが合成される。その結果、不溶性担体に固定化されたds-cDNAの構築が成される。

生じたcDNAの相補鎖は、その生産の間、標識dXTP類を取り込むことにより、標識させることができる。種々の標識方法のいくつか、例えば、放射性物質あるいはビオチンのような試薬—引き続き起こる比色的又は光発生反応で検出可能なのであるが—等が用いられる。

固定化cDNAは、更に種々のテクニックのため、利用できる。本発明の特に好ましい方法では、もし固定化ポリヌクレオチドがRNAプロモーター配列をもっているならば、アンチセンスRNAをつくることができる。そのとき、プロモーターに対する好適なRNAポリメラーゼが、4つのリボヌクレオチド三リン酸と共に加えられる。この分野の通常の知識をもつ技術者にとって明らかなように、

少なくともこれらヌクレオチド三リン酸の一つが標識をもっているならば、この際のアンチセンスRNAが標識されることは明らかであろう。

本発明の更に好ましい方法は、熱変性で生じた固定化アンチセンスss-cDNAに検体をハイブリダイズさせて、RNAプロット分析と同等の分析方法を提供できることである。熱変性後、センスss-cDNAは液相に来るであろう。このセンスss-cDNAは、例えば、PCR及び塩基配列決定のような種々の良く知られたテクニックに利用されるであろう。

これらの実験で使用されるmRNAは、好ましくは、精製mRNA、生物試料からのmRNA、又はRNase活性を阻害した細胞溶解液である。mRNAの精製は、ノーザンブロット又はドットブロット法で使用されるmRNA精製法が使える。市販のキットも入手できる。RNase活性を阻害した細胞溶解液を得る操作のためには、溶解用バッファーが好んで使われ、そこでは、生物試料は200 µg/mlプロテイナーゼK、10 mMバナジル・リボヌクレオシド・コンプレックス、500単位/ml RNaseインヒビター、0.5%ドデシル硫

酸ナトリウム (SDS) 及びエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) 含有の pH 8.0 溶液で処理される。

インキュベーションの温度は、その実験が核酸のハイブリダイゼーションか、酵素反応かによって、それぞれのケースで変動する。ハイブリダイゼーションは、検体の供試と題したセクションで既に述べている。

酵素反応においては、酵素が阻害されない温度ならばどんな温度でも構わないが、それぞれの酵素に最適な温度がよい。インキュベーションの時間は、30分～一晩で、振り混ぜの有無はいずれでもよい。酵素反応では、酵素活性を阻害しなければどんな緩衝液も使用できるが、それぞれの酵素活性に最適な緩衝液成分が好ましい。しかし、この緩衝液に RNase が混入していないことが重要である。もし RNase が存在するならば、その作用を RNasin 等のインヒビターを用いてできる限り最小に抑えておかねばならない。

更に付言すれば、二本鎖ポリヌクレオチド・コンプレックスを変性させるような加熱反応は、好適な緩衝液中で行われる。

固定化 ds-cDNA を含む不溶性担体は、DNase が混入していない溶液

好ましくは、DNase が混入しておらず、1 mM EDTA 及び 0.5 M 塩化ナトリウム含有の 20 mM、pH 7.6 のトリス-塩酸緩衝液から成る溶液の条件下で、4℃で少なくとも 1 ヶ月保存することができる。

固定化ポリヌクレオチドをもつ不溶性担体は、繰り返し何度も使用できる。事実、我々は、ヌクレオチド固定化担体を固定化ヌクレオチドの有意な損失なく、何度も使用した。固定化ポリヌクレオチドの再使用のために行う、ハイブリダイズされた mRNA の消化及び除去は、インキュベーションの後に RNase 含有液でリンスして行う。RNase 含有液の代わりに希 NaOH 溶液を用いて、固定化 cDNA からハイブリダイズされた mRNA を除去することもできる。第 2 の RNA プロモーターおよびセンス RNA の合成

本発明方法の一つの実施態様では、第 2 の RNA プロモーターがあることが望ましい。この第 2 の RNA プロモーターは、センス RNA の生産に向けられ使用

される。標識されたヌクレオチド三リン酸が、標識されたセンスRNAの生産に使用できる。第2のRNAプロモーターのヌクレオチド配列は、その下流に続く遺伝情報を転写・開始させるため用いられるRNAポリメラーゼで認識できる配列である。第2のRNAプロモーターは、通常は、d s - c DNAの第1のプロモーターの反対側に位置する。これらの配列は、ポリヌクレオチド固定化不溶性担体の第1のプロモーター配列とは異なるプロモーター結合サイトをコードする配列が好ましい。

本発明では、第2のRNAプロモーターと反応するRNAポリメラーゼは、第1のRNAプロモーターと交叉反応を起こしてはならない。仮に、第1のRNAプロモーターがバクテリオファージT7からのものであるとき、第2のRNAプロモーターは例えば、SP6プロモーターとすることができる。

第2のプロモーターを提供するため、第2のRNAプロモーター及び第2の制限酵素認識サイトを含むアダプターが使われる。このアダプターは、d s - c DNAの末端に付加される。好適なアダプターの例は、下記のSA1 I - SP6アダプターである (SEQ ID NO:3)。

```
5' -TCGACATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
3' -      GTAAATCCACTGTGATATCTT-5'
```

第2の制限酵素認識サイトは、好ましくは、ポリヌクレオチド固定化不溶性担体中にある制限酵素認識サイトと同じであってはならない。同じならば、消化されるmRNAの方向性が失われるからである。第1の制限酵素が、例えば、E c o R I 及び/又はN o t I ならば、第2の制限酵素がS m a I 及び/又はS a l I とする。

方向性をもったクローニング

一方の末端に第1の制限酵素サイト、及び他方の末端に第2の制限酵素サイトを含むd s - c DNA分子は、平滑末端連結により調製できる。この方法では、制限酵素サイト及びRNAプロモーター配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、T4リガーゼのような酵素を用いて、固定化d s - c DNAの固定されていない一方の末端に連結される。生じた修飾d s - c DNAは、両制限酵素サイトを

含む直鎖状ベクターに挿入される。第1の制限酵素サイトと第2の制限酵素サイトは類似していないので、ds-cDNAの連結は一方方向性をもって起こるであろう。この方法では、ベクターへのcDNAの挿入の方向はコントロールできる。

発明の図示的、例示的使用

本発明の好ましい実施態様を図示的に図3に示した。制限酵素認識サイト、RNAプロモーター、及びオリゴdT配列をもつ、30～100merのポリヌクレオチド配列を含む不溶性担体(a)は、ポリAテイルをもつmRNA含有検体液と混合される。生じた固定化ポリヌクレオチド-mRNAのコンプレックスは、固定化ヌクレオチドのオリゴdTテイルをプライマーとし、RNAを鋳型として、逆転写酵素と反応させる。その結果、mRNA-cDNAハイブリッドが不溶性担体(c)上で合成される。RNase及びDNAポリメラーゼの添加は、RNAの消化を伴い、RNA-cDNAハイブリッドは、不溶性担体(d)上に固定されたds-cDNAへと変換される。次いで、この固定されたds-cDNAは、低塩濃度で、例えば、水中でインキュベートされ、次いで加熱されてds-cDNAを変性させる。センスss-cDNAは、その相補ペアと水素結合を保

つことができず、溶液(e)中に遊離の形で浮遊する。浮遊するセンスss-cDNA(e)は、その後PCRの鋳型として興味対象の特異的遺伝子の増幅のため使用される。

上記ds-cDNA固定不溶性担体(d)の他の使用は、アンチセンスmRNA(f)の生産のためである。ds-cDNAのアンチセンス鎖に特異的なRNAポリメラーゼが、RNA分子の転写に使われる。次いで、マイクロタイター・プレートを加熱し、液を除去し、RNaseを含まないDNase(f)で消化することによって、アンチセンスmRNAが得られる。

本発明の更に別の実施態様は、ds-cDNA固定化担体(d)を二本鎖オリゴヌクレオチドの連結ターゲットとして使うことである。これらのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、第2のRNAプロモーター及び第2の制限酵素サイト(

g) に対応するヌクレオチド配列を含んでいる。そして、このコンプレックス (g) は、第2のプロモーターから転写が始まるRNAポリメラーゼと共にインキュベートすることによって、センスmRNAを合成できる。次いで、マイクロタイター・プレートを加熱し、液相を除去し、液相をRNaseを含まないDNase (h) で消化することによって、センスmRNAを合成できる。

この発明の種々の面を、以下の実施例によって更に詳細に説明する。これらの実施例は、分かりやすく説明することを意図したもので、本発明を何ら制限するものではない。

実施例 1

イン・ビトロで合成されたGs蛋白特異的なmRNAからの、ss-cDNA、ds-cDNA、センスmRNA及びアンチセンスmRNAの合成、並びにPCRによるGs蛋白特異的ds-cDNAの増幅

(1) ポリデオキシリボヌクレオチドの合成

DNAシンセサイザー380B (Applied Biosystems社製) を用いて、制限酵素EcoRI及びNotIが認識する塩基配列、T7RNAプロモーターの塩基配列並びにチミンが17個連続した塩基配列を含む下記の53merのポリデオ

キシリボヌクレオチドを合成した。このポリデオキシリボヌクレオチドの塩基配列 (SEQ ID NO:4) を、次に示す。

5' -AGCTGAATTC GCGGCCGCAA TACGACTCACT
ATAGTTTTT TTTTTTTTTTT TTT-3'

合成に当っては、Applied Biosystems社のプロトコールに従って、アミノリンク-2 (Applied Biosystems社製) を用い、このポリデオキシリボヌクレオチドの5'末端にアミノ基を導入した。合成後、30%水酸化アンモニウム中、55℃で、一晚、放置した後、スピード・バック (Savant社製) で乾燥し、DEPC処理水で1mg/mlとなるように溶解し、-20℃で保存した。

(2) マイクロタイタープレートへのポリデオキシリボヌクレオチドの固定

DEPC処理水に溶解した20mM EDC (Pierce社製) 液とDEPC処理水に溶解した10mMスルフォ-NHS (Pierce社製) 液を24μlずつ当量混

合し、これに上記(1)のポリデオキシリボヌクレオチド $2\mu\text{l}$ ($2\mu\text{g}$)を加え、この溶液をスミロンマイクロプレートMS-3796F(住友ベークライト社製)のウェル中に注ぎ、 37°C で一晩、インキュベートした。その後、反応液を 1mM EDTA及び 0.5M 塩化ナトリウムを含む 20M トリス塩酸緩衝液($\text{pH}7.6$)に置き換え、使用するまで、 4°C に保管した。

(3) mRNAの合成

ラットGs蛋白特異的mRNAを次のように合成した。

ラットGs蛋白のcDNAが挿入されたプラスミドベクターpGEM2の $100\mu\text{g}$ は米国ジョーンズ・ホプキンス大学、R. リード博士から供与を受けた。そのプラスミドを制限酵素Nhe I (Promega社製) 1000 ユニットで、 37°C 、2時間、消化し、直鎖状とした。 $\text{pH}7.4$ のトリス塩酸緩衝液で予め飽和させたフェノール、クロロホルム及びイソアミルアルコールの $25:24:1$ (容量比)混合液を等量加えてDNAを抽出したのち、これに 0.1 容の 3M 酢酸ナトリウムとドライアイスで冷した 2.5 容のエタノールを加え、30分間、DNA

を沈殿させた。次に、そのDNAを $15,000\text{rpm}$ 、 4°C 、20分間、遠心分離した(MTX-150、Tomy)。

沈殿を 70% エタノールに再懸濁し、 $15,000\text{rpm}$ 、 4°C 、5分間、再び遠心分離した。上清を除き、沈殿をスピード・バック減圧遠心で乾燥させ、DEPC処理水に再懸濁した。これに $5\times\text{RNA}$ 転写バッファー(Promega社製) $20\mu\text{l}$ 、 100mM DTT (Promega社製) $10\mu\text{l}$ 、RNase阻害剤(RNasin、Promega社製) 100 ユニット、 2.5mM リボヌクレオチド(Promega社製) $20\mu\text{l}$ 及びT7 RNAポリメラーゼ(Promega社製) 100 ユニットを加え、DEPC処理水で最終液量を $100\mu\text{l}$ とし、 37°C で2時間反応させた。その後、これにRNaseを含まないDNase (Promega社製) 100 ユニット($100\mu\text{l}$)を加え、 37°C で30分間反応させた。

DNAの消化ののち、予め水で飽和させたフェノール、クロロホルム及びイソアミルアルコールの $25:24:1$ (容量比)混合液を等量加え、RNAを抽出

した。ドライアイス上、0.1容の3M酢酸ナトリウムと2.5容の冷エタノールを加えて、30分間放置し、RNAを沈殿させた。その後、15,000rpm、4℃、20分間、遠心分離し(MTX-150、Tomy)、沈殿を70%エタノール1mlに再懸濁し、15,000rpm、4℃、5分間、再び遠心分離した。上清を除いた後、沈殿をスピード・バック減圧遠心で乾燥させ、DEPC処理水に再懸濁した。このRNAの260nmの吸光度を測定した(U-2000、日立製)。

260nmの吸光度が1.0のときRNA濃度は40 μ g/mlとして、液中のRNAの濃度を1.0 μ g/mlとなるように希釈した。これを5 μ lずつに分け、使用まで-70℃に保管した。

(4) マイクロタイタープレート上でのds-cDNAの合成

合成されたヒトGs蛋白特異的mRNAをDEPC処理水で希釈し、それぞれ、その5 μ g、1 μ g、100ng、10ng、1ng、100pg、10pg、1pg及び0.1pgを含むサンプル液5 μ lをとり、溶解バッファー45 μ l

を加え液量を50 μ lとし、45℃で1時間インキュベートして内在のRNaseを分解した。これに、最終濃度が0.5Mとなるように5M塩化ナトリウムを加えた。この液をポリデオキシリボヌクレオチド固定マイクロタイタープレートのウェルに注いだ。室温で30分間インキュベートし、そのmRNAのポリAテイルと固定化オリゴdTをハイブリダイズさせた。洗浄後、75mM塩化カリウム、3mM塩化マグネシウム、10mM DTT及び0.5mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)を含有する50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.3)50 μ l、並びに逆転写酵素(スーパースクリプト、Gibco-BRL社製)500ユニットを、それぞれのウェルに加え、37℃で1時間インキュベートし、mRNAを鋳型として第1のcDNA鎖を合成させた。

この「第1のcDNA鎖」合成後、その緩衝液を100mM塩化カリウム、5mM塩化マグネシウム、10mM硫酸アンモニウム、0.15mM酸化型 β -NAD、各0.25mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP及びdTTP

)、1.2mM DTT、65ユニット/ml DNAリガーゼ、250ユニット/ml DNAポリメラーゼおよび13ユニット/ml RNase H (Gibco-BRL社製)を含む25mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)(以下、ds-cDNA調製用バッファーという。)50μlに置き換え、16℃で3時間インキュベートし、第1のcDNA鎖からds-cDNAを合成した。反応終了後、液を1mM EDTA及び0.5M塩化ナトリウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)に置き換え、4℃に保管した。

(5) 固定化ヌクレオチドからのss-cDNAの合成

上記パラグラフ(4)で述べた固定化ds-cDNAをcDNA洗浄液で5回洗い、DEPC処理水50μlを加え、80℃、10分間加熱し、相補的cDNA鎖を変性させた。遊離のss-DNAを含む溶液を直ちに新鮮な0.65ml容チューブに移し、これを-20℃に保管した。プレートは、上記パラグラフ(4)で述べたようにして、ds-cDNA調製用バッファーとともに再度、16℃で3時間インキュベートし、ds-cDNA合成のため再使用した。この操作を3

回繰り返し、ウェル一つからss-cDNA液を合計3回採取した。

(6) アンチセンスmRNAの合成

上記パラグラフ(4)で得た固定化されたds-cDNAをRNA洗浄液で5回洗浄し、5×転写バッファー(Promega社製)10μl、100mM DTT 5μl、RNasin 50ユニット(1.25μl)、10mMリボヌクレオチド混合物10μl及びT7RNAポリメラーゼ20ユニット(1μl)を加え、DEPC処理水で液量を50μlとした。

37℃で一時間インキュベートしたのち、プレートを90℃で8分間加熱し、遊離のアンチセンスmRNA含有液を直ちに新鮮なチューブに移した。これに、RNaseを含まないDNase (Promega社製)10ユニット(10μl)を加え、37℃で30分間インキュベートし、残っているDNAを消化した。次いで、反応混合物に等量の水飽和フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)混合液を加え、RNAを抽出した。RNAをエタノール

で沈殿させ、15,000rpmで20分間、遠心分離した(MTX-150、Tomy)。沈殿を70%エタノール1mlに再懸濁し、15,000rpm、4℃で5分間、再度遠心分離した。上清を除いたのち、沈殿をスピード・バック遠心(Savant社製)で乾燥し、DEPC処理水5μlに再懸濁した。得られたアンチセンスmRNA分子を下記のアガロースゲル電気泳動で分析した。

mRNAの5μlに、40mM酢酸ナトリウム及び5mM EDTA(pH8.0)含有の0.1M MOPS(pH7.0)2μl、ホルムアミド10μl及びホルムアルデヒド3.5μlを加え、45℃、15分間加熱した。次いで、そのmRNA液に、10mM EDTA(pH8.0)、0.25%ブロモフェノールブルー及び0.25%キシレンシアノールFFを含有する50%グリセリン(ローディング・バッファー)2μl、及び1mg/mlエチジウムブロマイド1μlを加え、1%アガロースゲルに供試した。電気泳動は10mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、100V/6.5cm幅の電圧で、約1時間かけて行なった。電気泳動後、ゲルをUVで照射し、生じたRNA蛍光バンドを、図4(A)

に示すように、ポラロイドフィルム上に記録した。

図4の(A)のレーン1は、上記(3)の対照Gs蛋白mRNAを示し、レーン2及び3は、ここで合成されたGs蛋白mRNAの別々の二つの実験を示す。成されたmRNAの大きさは約2000塩基で、対照mRNAより少し大きかった。これは、多分3'末端に付加されたポリデオキシリボヌクレオチドに因るものと思われる。

(7) センスmRNAの合成

上記パラグラフ(4)で得たds-cDNA固定化マイクロタイターウェルをcDNA洗浄液で3回洗い、5×T4リガーゼバッファー(Gibco-BRL社製)10μl、DEPC処理水31μl、SEQ ID NO:3の配列のSalI-SP6アダプター4μl(4μg)及びT4リガーゼ(Gibco-BRL社製)5μl(5ユニット)を加え、16℃で一晩インキュベートした。

各ウェルをcDNA洗浄液で3回洗ったのち、Hバッファー(ベーリンガー・

マンハイム社製) 5 μ l、DEPC処理水 44 μ l 及びSalI (ペーリンガー・マンハイム社製) 1 μ l (10ユニット) を加えた。この液を 37℃で2時間インキュベートし、SalI サイトで切断した。各ウェルをRNA洗浄液で5回洗い、5×RNA転写バッファー 10 μ l、0.1M DTT 5 μ l、RNasein 125 μ l (50ユニット)、10mMリボヌクレオチド 10 μ l 及びSP6 RNAポリメラーゼ (Promega社製) 1 μ l (20ユニット) を加え、DEPC処理水で液量を 50 μ l とした。

37℃で1時間インキュベートしたのち、プレートを90℃で8分間加熱し、ウェル内の液体を直ちに新鮮なチューブに移した。RNaseを含まないDNaseの10 μ l (10ユニット) を加え、37℃で30分間インキュベートし、残存のDNAを消化した。次いで、反応混合物に等量の水飽和フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 混合液を加え、RNAを抽出した。このRNAをエタノールで沈殿させ、15,000rpmで20分間、遠心分離した (MTX-150、Tomy)。沈殿を70%エタノール1mlに

再懸濁し、15,000rpm、4℃で5分間、再度遠心分離した。上清を除いたのち、沈殿を乾燥し、DEPC処理水5 μ l に再懸濁した。

得られたmRNA分子を、パラグラフ (6) で述べたようにアガロース電気泳動で分析し、蛍光を発しているRNAバンドを図4 (B) に示すように、ポラロイドフィルムに記録した。図4 (B) のレーン1、2及び3は、それぞれ、上記パラグラフ (3) に記載したGs蛋白mRNA、上記パラグラフ (6) からの合成Gs蛋白mRNA、及びパラグラフ (7) の合成Gs蛋白mRNAを示す。合成mRNAの大きさは約2000塩基で、対照mRNAより少し大きかった。これは、多分3'末端に付加されたポリデオキシリボヌクレオチドに因るものと思われる。

(8) G蛋白特異的なds-cDNAの増幅用PCRプライマーの合成

G蛋白のアルファ・サブユニットに特異的なセンス (G2-s) 及びアンチセンス (G4-as) オリゴデオキシリボヌクレオチドを、パラグラフ (1) に記載したようにDNAシンセサイザーで合成した。塩基配列を次に示す。

G2-s 5' -AGCACCATTTGTGAAGCAGATGA-3' (SEQID NO:5)

G4-as 5' -CTCTGGCCTCCCACATCAAACA-3' (SEQID NO:6)

(9) PCRによるcDNAの増幅

パラグラフ(5)で取得したss-cDNAの1 μ lに、上記G2-s及びG4-asの2種類のヌクレオチド各0.1 μ g(1 μ l)、10 \times PCRバッファー(Promega社製)5 μ l、25mM塩化マグネシウム1 μ l、10mM dNTP混合物(Promega社製)4 μ l、Taqポリメラーゼ(Promega社製)0.5 μ l、及びDEPC処理水36.5 μ lを加えた。これに蒸発防止のためミネラルオイル2滴を加え重層した。初めに95 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、その後サーマルサイクラー480型(Perkin-Elmer Cetus社製)でPCR反応を行った。PCRは、5

5 $^{\circ}$ C/1.5分、72 $^{\circ}$ C/4分及び95 $^{\circ}$ C/1.5分の保温サイクルを30回繰り返した。

並行実験として、Gs蛋白のcDNA 10ng(1 μ l)を用い、陽性対照とした。得られたPCR産物の10 μ lに、10 \times ローディング・バッファー(0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノールFF及び15%フィコール、タイプ400)1 μ lを加え、65 $^{\circ}$ Cで15分間加熱し、その後、5 μ g/mlエチジウムブロマイド含有1.5%アガロースゲルに供試した。電気泳動は、1 \times TBEバッファー(0.001MのEDTAを含む0.045Mのトリス-ホウ酸緩衝液、pH8.0)中、100V/6.5cm幅の電圧で、約1時間かけて行なった。電気泳動後、図5に示すように蛍光を発するヌクレオチドバンドは、ポラロイドフィルム上に記録された。

図5において、ゲル(A)、(B)及び(C)は、それぞれ、連続的な実験結果である。ゲルのレーン2-10は、上記パラグラフ(5)で述べた初めのmRNAを、それぞれ、5 μ g、1 μ g、100ng、10ng、1ng、100pg、10pg、1pg及び0.1pg含んでいる。レーン11は陰性コントロールで、mRNAを含んでいない。図5に示すように、Gs蛋白のDNAは、初めの

10-100 pg の mRNA から再現性よく増幅され、その大きさは約 500 塩基対で、レーン 1 の陽性対照の大きさと同じ程度であった。

実施例 2

ヒト白血球からの、jun オンコジーン特異的な ds-cDNA 及び
センス ss-cDNA の合成、並びにその ds-cDNA の PCR 増幅

(I) ポリデオキシリボヌクレオチド固定化マイクロタイタープレート

ポリデオキシヌクレオチド固定化マイクロタイタープレートを、実施例 1 のパラグラフ (2) で述べたようにして調製した。

(II) ヒト白血球の細胞溶解液の調製

ヘパリン処理血 3 ml に 3 倍量のリン酸緩衝化生理食塩液 (PBS) を加え、これをイソリンフォ (Gallard-Schlesinger 社製) 3 ml 入りの 15 ml チューブに

加えて重層した。400 × g で 30 分間遠心分離後、イソリンフォと血漿のあいだの中間層の細胞を集め、これを PBS で 3 回、洗浄した。ペレット (細胞) に細胞溶解用バッファー 150 μl を加え懸濁し、太さ 18 G の注射針の中を繰返し通して、細胞を完全に溶解させた。次いで、細胞溶解液を、間歇的に攪拌しながら、45℃ で 30 分間インキュベートし、RNase を減らした。

(III) マイクロタイタープレート上での ds-cDNA の合成

パラグラフ (II) で調製した細胞溶解液に、最終濃度が 0.5 M となるように 5 M 塩化ナトリウムを加えた。これを、0.5 M 塩化ナトリウム含有細胞溶解用バッファーで 10 倍、100 倍及び 1000 倍に希釈した。得られた希釈液各 50 μl をポリデオキシリボヌクレオチド固定化マイクロタイタープレートのウェルに加え、室温で 30 分間インキュベートし、固定化ポリ dT 配列と分離細胞 mRNA のポリ A テイルとのあいだで、ハイブリダイズさせた。反応終了後、そのバッファーを除去し、各ウェルを RNA 洗浄液を用いて 2 回洗浄した。各ウェルに、逆転写酵素用バッファー 50 μl 及び逆転写酵素 500 ユニットを加え、37℃ で 1 時間インキュベートし、第 1 の cDNA 鎖の合成を開始させた。その反応バッファーを、ds-cDNA 調製用バッファー 50 μl と置き換え、16℃

で3時間インキュベートして、d s - c DNAを合成させた。

(IV) プレートからの s s - c DNAの合成

パラグラフ (III) で得た固定化 d s - c DNAを、c DNA洗浄液を用いて5回洗い、次いでDEPC処理水50 μ lを加えて、80℃で10分間加熱して、相補DNA鎖を変性させた。次いで、ウェルの液を新鮮な0.65 mlチューブに直ちに移し、これを-20℃で保存した。

(V) j u nオンコジーン特異的mRNAのPCR増幅用プライマーの合成

j u nオンコジーンに特異的な、下記の配列を有するセンス (j u n - s) 及びアンチセンス (j u n - a s) オリゴデオキシリボヌクレオチドを、実施例1パラグラフ (I) に記載したように、DNAシンセサイザーを用いて合成した。

jun-s : 5'-CCC TGA AGG AGG AGC CGC AGA C-3' (SEQ ID NO:7)

jun-as : 5'-CGT GGG TCA AGA CTT TCT GCT TGA GCT G-3' (SEQ ID NO:8)

(VI) c DNAのPCR増幅

上記パラグラフ (IV) で得たセンス s s - c DNA 1 μ lに、上記パラグラフ (V) の2種のオリゴデオキシリボヌクレオチド各1 μ l (0.1 μ g)、10 \times PCRバッファー (Promega社製) 5 μ l、25 mM塩化マグネシウム 1 μ l、10 mM d NTP混合物 (Promega社製) 4 μ l、T a qポリメラーゼ (Promega社製) 0.5 μ l及びDEPC処理水36.5 μ lを加えた。蒸発を防ぐために、2滴のミネラル油を反応物に加えて、重層した。反応混合物を、実施例1パラグラフ (9) に記載したように、はじめは95℃で10分間、次いで、55℃/1.5分、72℃/4分及び95℃/1.5分の保温サイクルを30回繰り返して、PCR増幅反応に供した。

得られたPCR産物の10 μ lに、10 \times ローディング・バッファー1 μ lを加え、これを5 μ g/mlエチジウムブロマイド含有1.5%アガロースゲルに供試した。電気泳動は、1 \times TBEバッファー中、100V/6.5 cm幅の電圧で、約1時間かけて行なった。電気泳動後、蛍光を発するDNAバンドを、図4に示されるようにポラロイドフィルム上に記録した。図6のレーン1-8は、それぞれ、白血球の1:1000希釈、原液 (血液1 mlに相当)、1:10希

積、及び1:100希釈についての、2回の実験結果を示している。図6に示したように、junオンコジーンは、細胞溶解液の原液のみではなく、1:10希釈や1:100希釈についても、cDNAの増幅が確認され、その大きさは370塩基対と評価した。この大きさは、理論値372塩基対と近似している。

実施例3

ヒト白血球からのタキニン受容体に特異的なds-cDNAのPCR増幅

(i) タキニン受容体に特異的なmRNAの増幅用PCRプライマーの合成

下記の2種類の塩基配列をもつオリゴデオキシリボヌクレオチド(tac-s及びtac-as)を、実施例1パラグラフ(1)に記載したように、DNAシンセサイザーで合成した。

tac-s : 5'-GCCAGCATCTACTCCATGAC-3' (SEQ ID NO:9)

tac-as : 5'-GGGCAGCCACGAGATGG-3' (SEQ ID NO:10)

(ii) cDNAのPCR増幅

実施例2のパラグラフ(IV)で調製した細胞溶解液原液からのss-cDNA 1μlに、上記tac-s及びtac-asオリゴデオキシリボヌクレオチド各0.1μg(1μl)、10×PCRバッファー5μl、25mM塩化マグネシウム1μl、10mM dNTP混合物4μl、Taqポリメラーゼ0.5μl及びDEPC処理水36.5μlを加え、混合した。蒸発を防ぐために、2滴のミネラル油を反応物に加えて、重層した。反応は、最初に95℃、10分間、加熱処理し、その後、アニーリング温度を45℃と55℃の2通り/1.5分とし、次いで、実施例1パラグラフ(9)に記載したように、エキステンションを72℃/4分、及び変性を95℃/1.5分とする加熱サイクルでPCRを実行した。PCR産物10μlを10×ローディングバッファー1μlと混ぜ、65℃、5分間加熱し、5μg/mlエチジウムブロマイド含有の1.5%アガロースゲルに供試した。電気泳動は、1×TBEバッファー中で、100V/6.5cm幅の電圧で約1時間かけて行った。電気泳動後、DNAバンドをボラロイドフィルム上で記録した。結果は、次の実施例4でディスカスされている。

実施例4

ヒト白血球からのオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) に特異的な
ds-cDNAのPCR増幅

a) ODC特異的mRNAのPCR用プライマーの合成

ODC特異的なセンス (ODC-s) 及びアンチセンス (ODC-as) オリゴデオキシ
リボヌクレオチドを、実施例1パラグラフ(1)に記載したようにDNAシンセ
サイザーで合成した。その塩基配列は下記に示した。

ODC-s : 5'-GACTCTGGAGTGAGAATCATA-3' (SEQ ID NO:1
1)

ODC-as : 5'-ATCCAATCACCACATGCATT-3' (SEQ ID NO:1
2)

b) cDNAのPCR増幅

細胞溶解液からの ss-cDNA 1 μ l に、上記2種類のオリゴデオキシリボ
ヌクレオチドODC-s及びODC-asを各0.1 μ g (1 μ l)、10 \times PCRバッ
ファー5 μ l、25mM塩化マグネシウム 1 μ l、10mM dNTP混合物4
 μ l及びTaqポリメラーゼ0.5 μ l、及びDEPC処理水36.5 μ lを加
え、混合した。蒸発を防ぐために、2滴のミネラル油を反応物に加えて、重層し
た。実施例1のパラグラフ(9)に記載したようにPCR反応を行った。PCR
産物10 μ lを10 \times ローディングバッファー1 μ lと混ぜ、65 $^{\circ}$ C、5分間加
熱し、5 μ g/mlエチジウムブロマイド含有の1.5%アガロースゲルに供試
した。電気泳動は、1 \times TBEバッファー中で、100V/6.5cm幅で約1
時間かけて行った。電気泳動後、ゲルを紫外線に当て、蛍光を発しているDNA
バンドをボラロイドフィルム上に、図7に示すように記録した。図7において、
レーン(A)及び(B)は、アニーリング温度がそれぞれ、45 $^{\circ}$ C及び55 $^{\circ}$ Cで
ある。レーン1、2、及び3は、それぞれ、ODC、タキキニン受容体及びj u
nオンコジーンである。図7に示されるように、ODC遺伝子は、アニーリング
温度が45 $^{\circ}$ C及び55 $^{\circ}$ Cのいずれでも増幅されたのに対して、タキキニン受容体
及びj u nオンコジーン遺伝子は、45 $^{\circ}$ Cにおいてのみ増幅された。

実施例5

ポリデオキシリボヌクレオチド固定化マイクロタイタープレート上で
合成された d s - c DNA からの c DNA ライブラリーの構築と
バクテリアへの c DNA ライブラリーの導入

(1) マイクロタイタープレート上で合成された d s - c DNA への S P 6 - S
a l I アダプターの連結

実施例 2 パラグラフ (III) で述べた、マイクロタイタープレート上で合成さ
れたヒト白血球の d s - c DNA は、S P 6 - S a l I アダプターが連結され、
その後、実施例パラグラフ (7) で述べたように、S a l I で消化された。

(2) マイクロタイタープレートからの d s - c DNA の除去

S a l I による消化ののち、ウェルを c DNA 洗浄液で 3 回洗浄し、これに、
H バッファー 5 μ l、DEPC 処理水 44 μ l 及び N o t I (ベーリンガーマン
ハイム社製) 1 μ l (10 ユニット) を加え、37℃で一晩インキュベートし、
固定化ポリデオキシリボヌクレオチド上の N o t I サイトで切断した。反応液は
新鮮な 0.65 ml チューブに移し、65℃、20 分間、加熱して N o t I を失
活させた。

(3) ベクターへの d s - c DNA の挿入 (c DNA ライブラリーの構築)

上記の加熱失活液の d s - c DNA を 10 μ l とり、これに 5 \times T4 リガーゼ
バッファー 4 μ l、DEPC 処理水 4 μ l、予め S a l I 及び N o t I で処理し
た p S P O R T ベクター (Gibco-BRL 社製) 1 μ l (50 ng)、及び T4 リガ
ーゼ (Gibco-BRL 社製) 1 μ l を加え、室温で 3 時間インキュベートし、分離し
た d s - c DNA をベクターに連結した。c DNA - ベクター複合体を沈殿させ
るため、これに酵母 t R N A (Gibco-BRL 社製) 5 μ l (5 μ g)、7.5 M 酢
酸アンモニウム 12.5 μ l 及びエタノール 70 μ l を加え、-70℃で一晩静
置した。15,000 r p m、4℃で 20 分間、遠心分離し、DNA を沈殿させ
、沈殿を 70% エタノール 0.5 ml に再懸濁し、15,000 r p m で 5 分間
、再遠心分離した。上清を除去後、沈殿をスピード・バック遠心で乾燥させ、こ
れを DEPC 処理水に再懸濁した。

(4) トランスフォーメーション (形質転換)

上記の cDNA が挿入されたプラスミドを DEPC 処理水 5 μ l に再懸濁した。この懸濁液 1 μ l をとり、これにコンピテント細胞（エレクトロマックス DH 10 α 、Gibco-BRL 社製）25 μ l を加え、氷上で混合し、0.1 cm の専用キューベツト（バイオラツド社製）に注し、ジーンパルサー（バイオラツド社製）を用いて、16.6 V/cm の電気刺激を与え、細胞内に cDNA ライブラリーを取り込ませた。その後、SOC バッファー（Gibco-BRL 社製）1 ml を加え、細胞を新鮮な 10 ml ポリプロピレンチューブに移した。細胞混合物を 37℃ で正確に 1 時間、225 rpm で振り混ぜながら、インキュベートした。細胞を SOC 培地で 10 倍及び 100 倍に希釈後、その 50 μ l を 100 μ g/ml のアンピシリン含有 LB 培地に塗布し、37℃ で一晚インキュベートした。こうして、培地

上に出現したコロニー数をカウントした。

表 1 は、その結果である。1 ml の血液の白血球当り、それぞれのウェルから約 60,000 ~ 900,000 のコロニーが得られた。

表 1

実験番号	コロニーの数*
1	900,000
2	850,000
3	600,000

* 1 ml の血液の白血球に換算。

この実験は、ds-cDNA は増幅され、続いてプラスミドベクターにクローン化されうことを示している。この方法は、効率性及び迅速性の点で有利である。

実施例 6 種々のオリゴヌクレオチド固定化プレートから、イン・ビトロ合成された Gs 蛋白特異的 mRNA からの、Gs 蛋白特異的 ss-及び ds-cDNA の合成、並びに Gs 蛋白特異的 ds-cDNA の PCR 増幅

(1) ポリデオキシリボヌクレオチドの合成

Sma I と Sal I のような二つの異なる制限酵素サイト、T7 RNA プロモ

ーター配列、及びそれに続く5' から3' への17個のチミン残基を含む50merのポリデオキシリボヌクレオチドを実施例1の記載と同様にして、合成した。このポリデオキシリボヌクレオチド配列を、以下に示した。

5' -GGGGCCCCGGGGTCGACAATACGACTCACTATAG
TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO:13)

EcoRIとNotIのような二つの異なる制限酵素サイト、SP6RNAプロモーター配列、及びそれに続く5' から3' への17個のチミン残基を含む56merのポリデオキシリボヌクレオチドを実施例1の記載と同様にして、合成した。このポリデオキシリボヌクレオチド配列を、以下に示した。

5' -GGGGGAATTTCGCGGCCGCCATTTAGGTGACACT
ATAGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO:14)

実施例1に述べたようにアミノリンク2を用いて、これらのポリデオキシリボヌクレオチドの5' 末端に、第一級アミン残基を導入した。

(2) マイクロタイタープレートへのポリデオキシリボヌクレオチドの固定化

20mM EDC (ピアース社製) 及び10mM スルフォ-NHS (ピアース社製) のDEPC-水の溶液24 μ lと合成ポリデオキシリボヌクレオチド2 μ l (2 μ g) を混ぜ、これをマイクロタイタープレート (MS-3796F、住友ベークライト社製) のウェルに加えた。プレートを37℃で一晩、インキュベート後、各ウェルの反応液を1mM EDTA、及び0.5M塩化ナトリウム含有20mMトリス緩衝液 (pH7.6) で置き換えた。

(3) マイクロタイタープレート上でのds-cDNA合成

実施例1の記載と同様に合成して得られたGs蛋白のmRNAの2 μ gを、0.5M塩化ナトリウムを含む溶解用バッファーに溶かして液量を50 μ lとしこれを、ポリデオキシリボヌクレオチド固定化マイクロタイタープレートのウェルに加えた。プレートを室温で30分間、インキュベートしたのち、各ウェルをRNA洗浄用バッファーで2回洗い、次いで、スーパースクリプトの代わりにMMLV-逆転写酵素を使ったほかは実施例1の記載と同様に合成して、cDNAをプレート上で合成した。第1のcDNA鎖の合成の後に実施例1の記載と同様に

して、プレート上で第2のcDNA鎖を合成した。ds-cDNA合成のウェルは、cDNA洗浄用バッファーで5回洗ったのち、DEPC処理水50 μ lを加え、80℃で10分間加熱し、DNA二重コイルを変性させた。その液は、直ちに新鮮な0.65mlチューブに移し、使用するまで20℃に保管した。

(4) cDNAのPCR増幅

上記(3)のss-cDNA1 μ lに、実施例1で記載したG2-s及びG4-a sの各0.1 μ g (1 μ l)、10 \times PCRバッファー5 μ l、25mM塩化マグネシウム1 μ l、10mM dNTP混合物4 μ l及びTaqポリメラーゼ0.5 μ l、及びDEPC処理水36.5 μ lを加え、混合し、次いで蒸発を防ぐため2滴のミネラル油を反応物に加え重層した。初めはチューブを95℃、

10分間、加熱し、その後、サーマルサイクラー(480型、Perkin-Elmer-Cetus社製)を用い、55℃、1.5分のアニーリング処理を30回行った。PCR産物10 μ lを10 \times ローディングバッファー1 μ lと混ぜ、65℃、5分間加熱後、5 μ g/mlエチジウムブロマイド含有の1.5%アガロースゲルに供試した。電気泳動は、1 \times TBEバッファー中で、100V/6.5cm幅で約1時間かけて行った。電気泳動後、ゲルに紫外線を当ててDNAバンドを視覚化し、これをポラロイドフィルム上に、図6Aに示すように記録した。図6A中、レーン2及び3は、SEQ ID NO:13の配列をもつポリヌクレオチドが固定されたプレートからの二つの結果を示し、レーン5及び6は、SEQ ID NO:14の配列をもつポリヌクレオチドが固定されたプレートからの二つの結果を示す。レーン1及び4は、それぞれ、SEQ ID NO:13及び14の配列をもつポリヌクレオチドが固定されたプレートからの陰性対照(mRNA無添加)である。

以上のように、これらの実施例は本発明の広範な利用性を示している。しかし、これらの実施例は、本発明を分かりやすく説明することを意図したものであって、本発明を制限するものではなく、本発明の範囲は、次のクレームで説明されるものである。

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人：ケラー, シリア (Keller, Cylia)

ミツハシ, マサト (Mitsuhashi, Masato)

アキタヤ, タツオ (Akitaya, Tatsuo)

(ii) 発明の名称：メッセンジャーRNAを測定するための方法と試薬

(iii) 配列数： 12

(vi) 連絡先：

(A) 宛名：クノーピ・マーテンズ・オルソン アンド ベアー

(B) 番地：620ニューポートビーチ センタードライブ16階

(C) 市：ニューポートビーチ

(D) 州：カリフォルニア

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) ZIP:92660

(v) コンピュータ読取り可能形式

(A) 媒体：フロッピーディスク

(B) コンピュータ：IBM PC 互換

(C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) 現行出願データ

(A) 出願番号

(B) 出願日

(C) 分類

(viii) 代理人/事務所情報

(A) 名前：アルトマン, ダニエル イー

(B) 登録番号：34,115

(C) 整理番号：HITACHI.002A

(ix) 通信情報

(A) 電話番号：714-760-0404

(B) ファクシミリ番号 : 714-760-9502

(2) SEQ ID NO:1に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 17

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチ・センス : NO

(vi) オリジナル出所

(A) 組織 : T 7 プロモーター配列

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:1

AATACGACTC ACTATAG

17

(2) SEQ ID NO:2に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 21

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチ・センス : NO

(vi) オリジナル出所

(A) 組織 : S P 6 プロモーター配列

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:2

CATTAGGTG AACTATAGA A

21

(2) SEQ ID NO:3に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ: 25
 - (B) 種類: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 分子タイプ: cDNA to mRNA
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチ・センス: NO
- (v) オリジナル出所
 - (A) 組織: SALI SP6アダプター配列
- (xi) 配列の説明: SEQ ID NO:3

TCGACATTTA GGTGACACTA TAGAA

25

(2) SEQ ID NO:4に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ: 53
 - (B) 種類: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 分子タイプ: cDNA to mRNA
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチ・センス: NO
- (v) オリジナル出所
 - (A) 組織: EcoRI, NotI及びT7プロモーターを含む53merオリゴ
- (xi) 配列の説明: SEQ ID NO:4

AGCTGAATTC GCGGCCGCAA TACGACTCAC TATAGTTTTT TTTTTTTTTT TTT

53

(2) SEQ ID NO:5に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 22
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチ・センス : NO

(vi) オリジナル出所

(A)組織 : G2-Sオリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:5

AGCACCAT TG TGAAGCAGAT GA

22

(2) SEQ ID NO:6に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 22
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチ・センス : NO

(vi) オリジナル出所

(A)組織 : G2-ASオリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:6

CTCTGGCCTC CCACATCAAA CA

22

(2) SEQ ID NO:7に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 22
- (B) 種類: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子タイプ: cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチ・センス: NO

(vi) オリジナル出所

(A) 組織: JUN-Sオリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の説明: SEQ ID NO:7

CCCTGAAGGA GGAGCCGCAG AC

22

(2) SEQ ID NO:8に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 28
- (B) 種類: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子タイプ: cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチ・センス: NO

(vi) オリジナル出所

(A) 組織: JUN-ASオリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の説明: SEQ ID NO:8

CGTGGGTCAA GACTTTCTGC TTGAGCTG

28

(2) SEQ ID NO:9に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ : 20
 - (B) 種類 : 核酸
 - (C) 鎖の数 : 一本鎖
 - (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA
- (iii) ハイボセティカル : NO
- (iv) アンチ・センス : NO
- (vi) オリジナル出所
 - (A) 組織 : TAC-Sオリゴヌクレオチドプライマー
- (xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:9

GCCAGCATCT ACTCCATGAC

20

(2) SEQ ID NO:10に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ : 17
 - (B) 種類 : 核酸
 - (C) 鎖の数 : 一本鎖
 - (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA
- (iii) ハイボセティカル : NO
- (iv) アンチ・センス : NO
- (vi) オリジナル出所
 - (A) 組織 : TAC-ASオリゴヌクレオチドプライマー
- (xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:10

GGGCAGCCAC GAGATGG

17

(2) SEQ ID NO:11に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 21
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA
- (iii) ハイボセティカル : NO
- (iv) アンチ・センス : NO
- (vi) オリジナル出所
 - (A) 組織 : ODC-Sオリゴヌクレオチドプライマー
- (xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:11

GACTCTGGAG TGAGAATCAT A

21

(2) SEQ ID NO:12に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 21
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA
- (iii) ハイボセティカル : NO
- (iv) アンチ・センス : NO
- (vi) オリジナル出所
 - (A) 組織 : ODC-ASオリゴヌクレオチドプライマー
- (xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:12

ATCCAATCAC CCACATGCAT T

21

(2) SEQ ID NO:13に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 50

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチ・センス : NO

(vi) オリジナル出所

(A) 組織 : SmaI及びSalI部位及びT7 RNAプロモーターを含む50 merオリゴ

ゴ

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:13

GGGGCCCCGGG GTCGACAATA CGACTCACTA TAGTTTTTTT TTTTTTTTTT

54

(2) SEQ ID NO:14に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 56

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチ・センス : NO

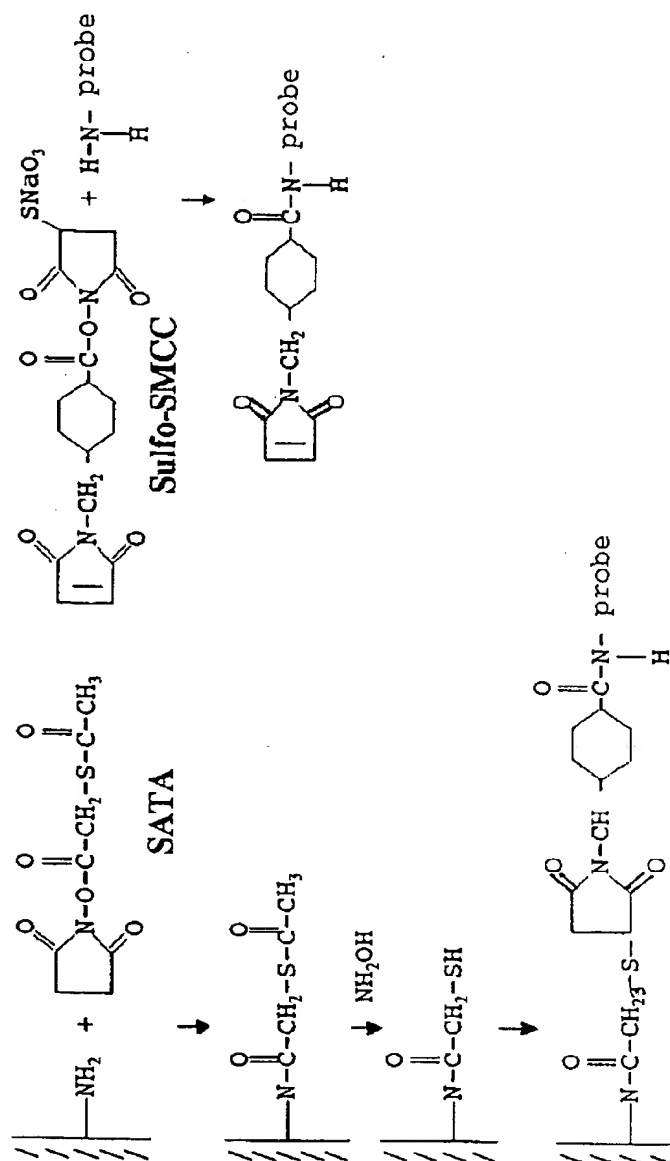
(vi) オリジナル出所

(A) 組織 : EcoRI及びNotI及びSP6 RNAプロモーターを含む56 merオリ

ゴ

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:14

【図 1】



SATA : スクシンイミドイル-S-アセチルチオアセテート

Sulfo-SMCC : スルホスクシンイミドイル-4-(N-エチル-2-イソチアゾリル)シクロヘキサノ-1-カルボキシル

FIG. 1

【図8】

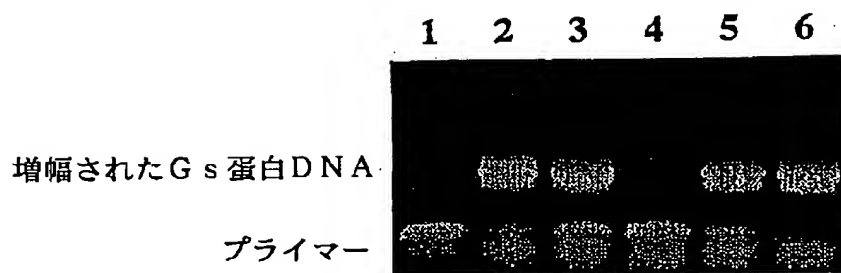
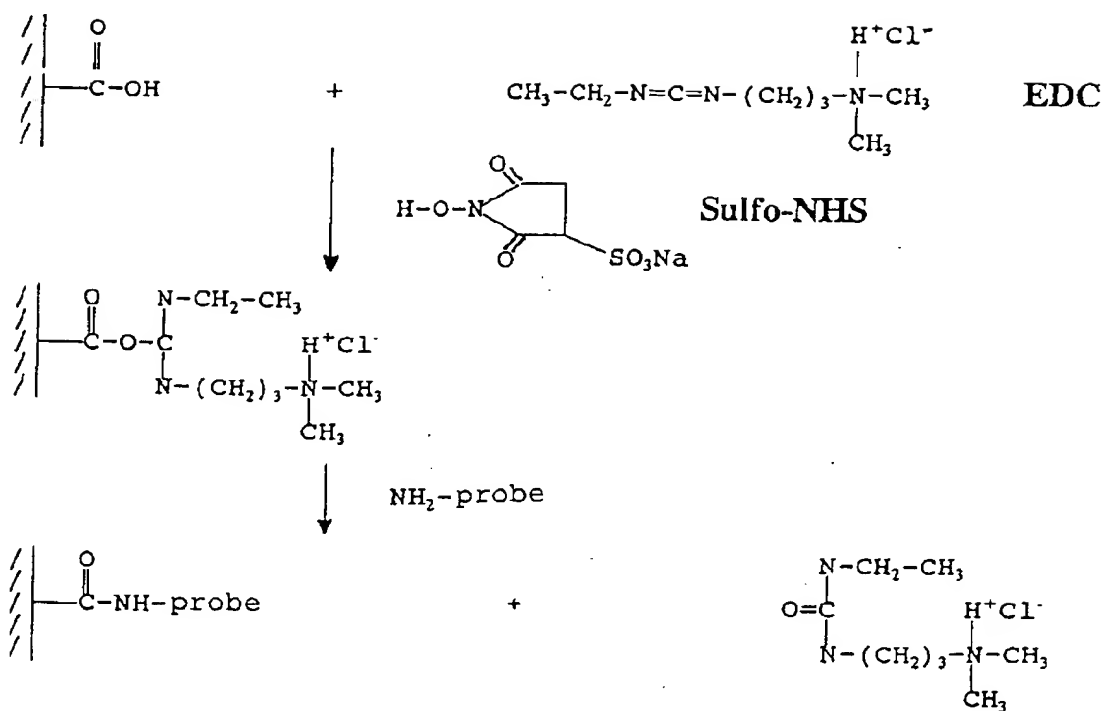


FIG. 8

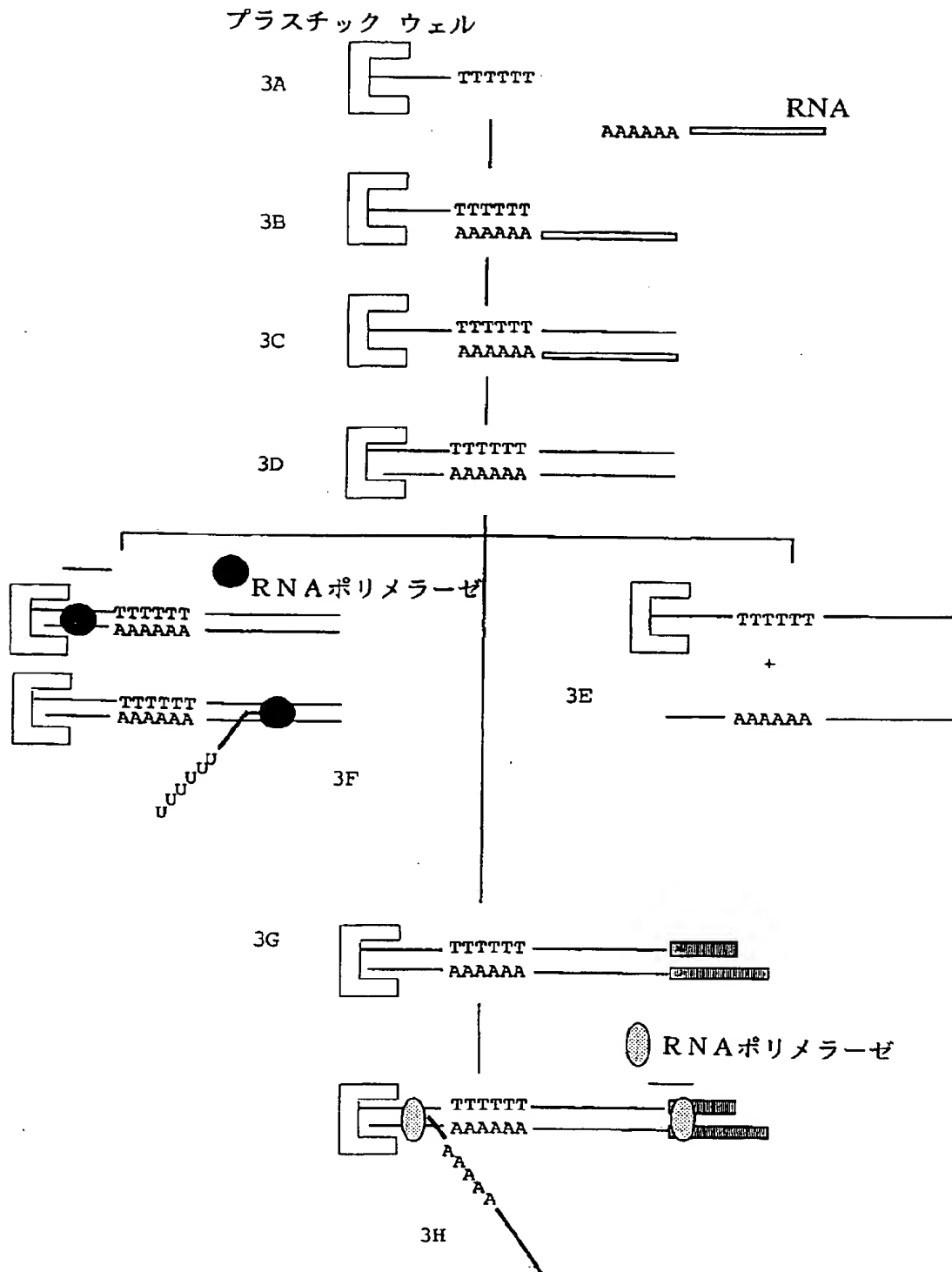
【図2】



EDC : 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩
 Sulfo-NHS : N-ヒドロキシスルフォスクシンイミド

FIG. 2

【図3】



【図 4 A】

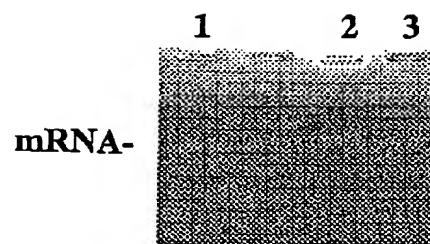


FIG. 4A

【図 4 B】

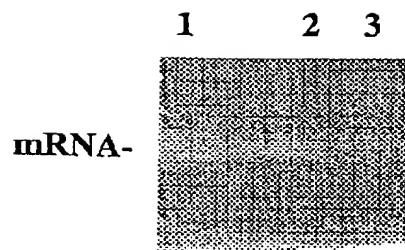
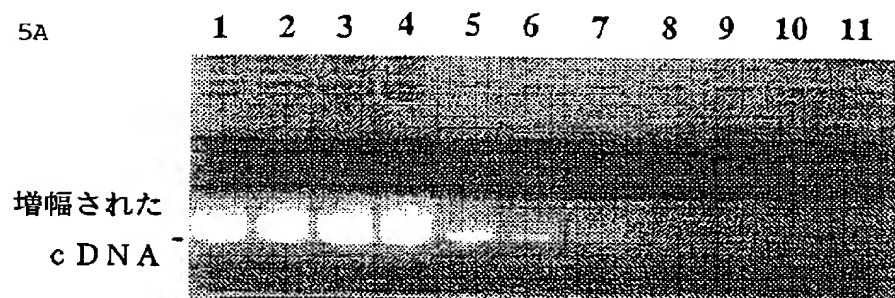


FIG. 4B

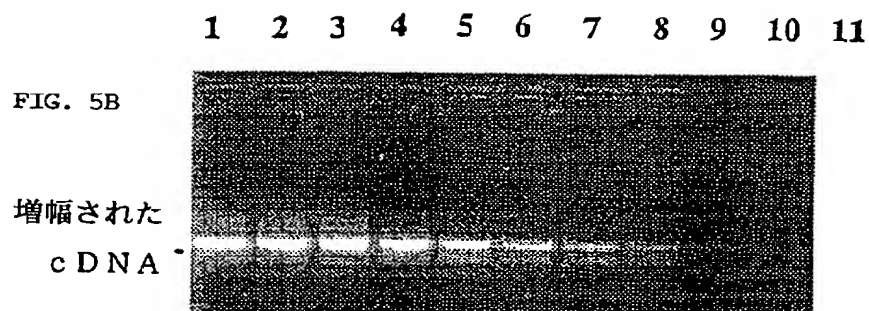
【図 5 A】

FIG. 5A

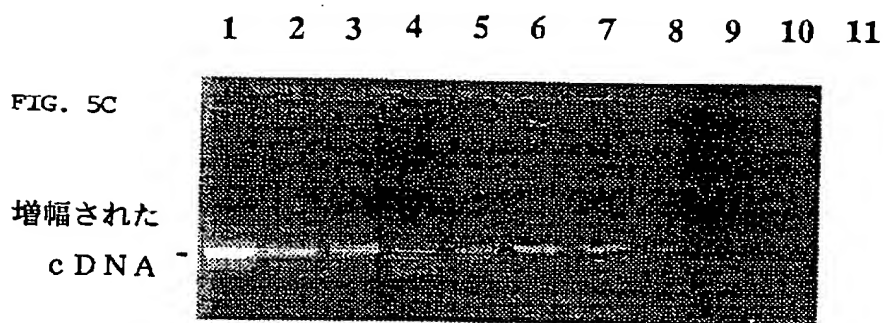


【図 5 B】

FIG. 5B



【図5C】



【図6】

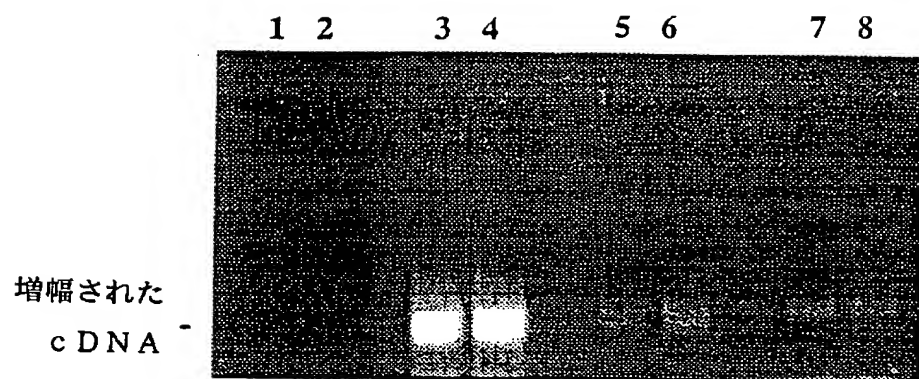
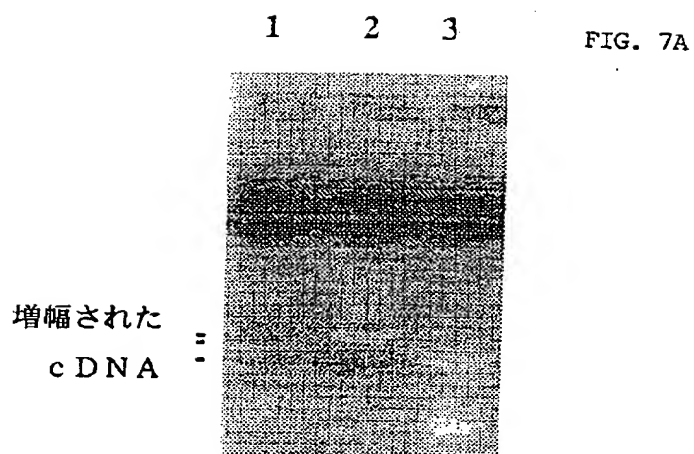


FIG. 6

【図7A】



【図 7 B】

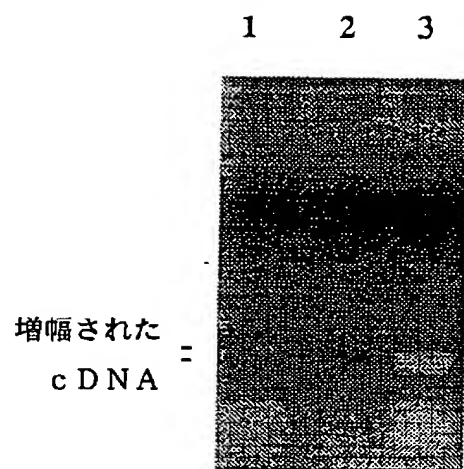


FIG. 7B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/01040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(5) : C12Q 01/68; C12P 19/34; C12N 09/10, 09/12; C07H 17/00, 15/12 US CL : 435/6, 91, 193, 194; 536/23.1, 27.1, 28.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91, 193, 194; 536/23.1, 27.1, 28.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, Dialog, Medline		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, A, 90/06042 (Hornes et al.) 14 June 1990, see entire document.	1-44
Y	EP, A, 0,329,822 (Davey et al.) 30 August 1989, see pages 7 and 15, claim 13.	1-28, 34-44
Y	Nucleic Acids Research, Volume 19, No. 14, issued 1991, I. Raineri et al., "Improved Efficiency for Single-Sided PCR by Creating a Reusable Pool of First-Strand cDNA coupled to a Solid Phase", page 4010, see Figure A.	1-28, 34-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 APRIL 1993		Date of mailing of the international search report 14 MAY 1993
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. NOT APPLICABLE		Authorized officer <i>Diane Moffett for</i> KATHLEEN L. CHOI Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/01040

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Journal of Clinical Microbiology, Volume 28, No. 6, issued June 1990, S. Inouye et al., "Microplate Hybridization of Amplified Viral DNA Segment", pages 1469-1472, see entire document.	1-28, 34-44
Y	T.R. Sambrook et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", published 1989 by Cold Spring Harbor Laboratory Press (N.Y.), see pages 7.26-7.29 and 8.21-8.35.	1-28, 34-44
Y	Gene, Volume 52, issued 1987, M.J. Palazzolo et al., "A Family of Lambda Phage cDNA Cloning Vectors, λ SWAJ, Allowing the Amplification of RNA Sequences", pages 197-206, see Figure 2.	27-28, 42-44
Y	EP, A, 0,152,886 (Dattagupta) 28 August 1985, see Figure 2.	29-33
Y	Analytical Biochemistry, Volume 164, No. 2, issued 01 August 1987, R. Bischoff et al., "Introduction of 5'-Terminal Functional Groups into Synthetic Oligonucleotides for Selective Immobilization", pages 336-344, see entire document.	29-33
Y	Nucleic Acids Research, Volume 19, No. 6, issued 25 March 1991, S. Stamm et al., "Sanchored PCR: PCR with cDNA Coupled to a Solid Phase", page 1350, entire document.	29-33
Y	Analytical Biochemistry, Volume 132, issued 1983, R.J.S. Duncan et al., "A New Reagent Which May be Used to Introduce Sulfhydryl Groups into Proteins, and its Use in the Preparation of Conjugates for Immunoassay", pages 68-74, see entire document.	32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.